

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**PURIFICATION, CARACTÉRISATION ET CLONAGE
D'HÉMICELLULASES THERMOSTABLES
DE LA BACTÉRIE *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS***

Par

Guyline Talbot

Département de biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

***philosophiae doctor* (Ph. D.)**

Le 19 avril 1995



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

THE AUTHOR HAS GRANTED AN
IRREVOCABLE NON-EXCLUSIVE
LICENCE ALLOWING THE NATIONAL
LIBRARY OF CANADA TO
REPRODUCE, LOAN, DISTRIBUTE OR
SELL COPIES OF HIS/HER THESIS BY
ANY MEANS AND IN ANY FORM OR
FORMAT, MAKING THIS THESIS
AVAILABLE TO INTERESTED
PERSONS.

L'AUTEUR A ACCORDE UNE LICENCE
IRREVOCABLE ET NON EXCLUSIVE
PERMETTANT A LA BIBLIOTHEQUE
NATIONALE DU CANADA DE
REPRODUIRE, PRETER, DISTRIBUER
OU VENDRE DES COPIES DE SA
THESE DE QUELQUE MANIERE ET
SOUS QUELQUE FORME QUE CE SOIT
POUR METTRE DES EXEMPLAIRES DE
CETTE THESE A LA DISPOSITION DES
PERSONNE INTERESSEES.

THE AUTHOR RETAINS OWNERSHIP
OF THE COPYRIGHT IN HIS/HER
THESIS. NEITHER THE THESIS NOR
SUBSTANTIAL EXTRACTS FROM IT
MAY BE PRINTED OR OTHERWISE
REPRODUCED WITHOUT HIS/HER
PERMISSION.

L'AUTEUR CONSERVE LA PROPRIETE
DU DROIT D'AUTEUR QUI PROTEGE
SA THESE. NI LA THESE NI DES
EXTRAITS SUBSTANTIELS DE CELLE-
CI NE DOIVENT ETRE IMPRIMES OU
AUTREMENT REPRODUITS SANS SON
AUTORISATION.

ISBN 0-612-04545-5

Canada

Num. _____

Dissertation Abstracts International est organisé en catégories de sujets. Veuillez s.v.p. choisir le sujet qui décrit le mieux votre thèse et inscrire le code numérique approprié dans l'espace réservé ci-dessous.

Biochimie

SUJET

487

U·M·I

CODE DE SUJET

Catégories par sujets

HUMANITÉS ET SCIENCES SOCIALES

COMMUNICATIONS ET LES ARTS

Architecture	0729
Beaux-arts	0357
Bibliothéconomie	0399
Cinéma	0900
Communication verbale	0459
Communications	0708
Danse	0378
Histoire de l'art	0377
Journalisme	0391
Musique	0413
Sciences de l'information	0723
Théâtre	0465

ÉDUCATION

Généralités	515
Administration	0514
Art	0273
Collèges communautaires	0275
Commerce	0688
Économie domestique	0278
Éducation permanente	0516
Éducation préscolaire	0518
Éducation sanitaire	0680
Enseignement agricole	0517
Enseignement bilingue et multiculturel	0282
Enseignement industriel	0521
Enseignement primaire	0524
Enseignement professionnel	0747
Enseignement religieux	0527
Enseignement secondaire	0533
Enseignement spécial	0529
Enseignement supérieur	0745
Évaluation	0288
Finances	0277
Formation des enseignants	0530
Histoire de l'éducation	0520
Langues et littérature	0279

Lecture	0535
Mathématiques	0280
Musique	0522
Orientation et consultation	0519
Philosophie de l'éducation	0998
Physique	0523
Programmes d'études et enseignement	0727
Psychologie	0525
Sciences	0714
Sciences sociales	0534
Sociologie de l'éducation	0340
Technologie	0710

LANGUE, LITTÉRATURE ET LINGUISTIQUE

Langues	
Généralités	0679
Anciennes	0289
Linguistique	0290
Modernes	0291
Littérature	
Généralités	0401
Anciennes	0294
Comparée	0295
Médiévale	0297
Moderne	0298
Africaine	0316
Américaine	0591
Anglaise	0593
Asiatique	0305
Canadienne (Anglaise)	0352
Canadienne (Française)	0355
Germanique	0311
Latino-américaine	0312
Moyen-orientale	0315
Romane	0313
Slave et est-européenne	0314

PHILOSOPHIE, RELIGION ET THÉOLOGIE

Philosophie	0422
Religion	
Généralités	0318
Clergé	0319
Études bibliques	0321
Histoire des religions	0320
Philosophie de la religion	0322
Théologie	0469

SCIENCES SOCIALES

Anthropologie	
Archéologie	0324
Culturelle	0326
Physique	0327
Droit	0398
Économie	
Généralités	0501
Commerce-Affaires	0505
Économie agricole	0503
Économie du travail	0510
Finances	0508
Histoire	0509
Théorie	0511
Études américaines	0323
Études canadiennes	0385
Études féministes	0453
Folklore	0358
Géographie	0366
Gérontologie	0351
Gestion des affaires	
Généralités	0310
Administration	0454
Banques	0770
Comptabilité	0272
Marketing	0338
Histoire	
Histoire générale	0578

Ancienne	0579
Médiévale	0581
Moderne	0582
Histoire des noirs	0328
Africaine	0331
Canadienne	0334
États-Unis	0337
Européenne	0335
Moyen-orientale	0333
Latino-américaine	0336
Asie, Australie et Océanie	0332
Histoire des sciences	0585
Loisirs	0814
Planification urbaine et régionale	0999
Science politique	
Généralités	0615
Administration publique	0617
Droit et relations internationales	0616
Sociologie	
Généralités	0626
Aide et bien-être social	0630
Criminologie et établissements pénitentiaires	0627
Démographie	0938
Études de l'individu et de la famille	0628
Études des relations interethniques et des relations raciales	0631
Structure et développement social	0700
Théorie et méthodes	0344
Travail et relations industrielles	0629
Transports	0709
Travail social	0452

SCIENCES ET INGÉNIERIE

SCIENCES BIOLOGIQUES

Agriculture	
Généralités	0473
Agronomie	0285
Alimentation et technologie alimentaire	0359
Culture	0479
Élevage et alimentation	0475
Exploitation des péturages	0777
Pathologie animale	0476
Pathologie végétale	0480
Physiologie végétale	0817
Sylviculture et faune	0478
Technologie du bois	0746
Biologie	
Généralités	0306
Anatomie	0287
Biologie (Statistiques)	0308
Biologie moléculaire	0307
Botanique	0309
Cellule	0379
Écologie	0329
Entomologie	0353
Génétique	0369
Limnologie	0793
Microbiologie	0410
Neurologie	0317
Océanographie	0416
Physiologie	0433
Radiation	0821
Science vétérinaire	0778
Zoologie	0472
Biophysique	
Généralités	0786
Médicale	0760

SCIENCES DE LA TERRE

Biogéochimie	0425
Géochimie	0996
Géodésie	0370
Géographie physique	0368

Géologie	0372
Géophysique	0373
Hydrologie	0388
Minéralogie	0411
Océanographie physique	0415
Paléobotanique	0345
Paléoécologie	0426
Paléontologie	0418
Paléozoologie	0985
Palynologie	0427

SCIENCES DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT

Économie domestique	0386
Sciences de l'environnement	0768
Sciences de la santé	
Généralités	0566
Administration des hôpitaux	0769
Alimentation et nutrition	0570
Audiologie	0300
Chimiothérapie	0992
Dentisterie	0567
Développement humain	0758
Enseignement	0350
Immunologie	0982
Loisirs	0575
Médecine du travail et thérapie	0354
Médecine et chirurgie	0564
Obstétrique et gynécologie	0380
Ophtalmologie	0381
Orthophonie	0460
Pathologie	0571
Pharmacie	0572
Pharmacologie	0419
Physiothérapie	0382
Radiologie	0574
Santé mentale	0347
Santé publique	0573
Soins infirmiers	0569
Toxicologie	0383

SCIENCES PHYSIQUES

Sciences Pures

Chimie	
Généralités	0485
Biochimie	0487
Chimie agricole	0749
Chimie analytique	0486
Chimie minérale	0488
Chimie nucléaire	0738
Chimie organique	0490
Chimie pharmaceutique	0491
Physique	0494
Polymères	0495
Radiation	0754
Mathématiques	0405
Physique	
Généralités	0605
Acoustique	0986
Astronomie et astrophysique	0606
Électronique et électricité	0607
Fluides et plasma	0759
Météorologie	0608
Optique	0752
Particules (Physique nucléaire)	0798
Physique atomique	0748
Physique de l'état solide	0611
Physique moléculaire	0609
Physique nucléaire	0610
Radiation	0756
Statistiques	0463

Sciences Appliquées Et Technologie

Informatique	0984
Ingénierie	
Généralités	0537
Agricole	0539
Automobile	0540

Biomédicale	0541
Chaleur et ther modynamique	0348
Conditionnement (Emballage)	0549
Génie aérospatial	0538
Génie chimique	0542
Génie civil	0543
Génie électronique et électrique	0544
Génie industriel	0546
Génie mécanique	0548
Génie nucléaire	0552
Ingénierie des systèmes	0790
Mécanique navale	0547
Métallurgie	0743
Science des matériaux	0794
Technique du pétrole	0765
Technique minière	0551
Techniques sanitaires et municipales	0554
Technologie hydraulique	0545
Mécanique appliquée	0346
Géotechnologie	0428
Matières plastiques (Technologie)	0795
Recherche opérationnelle	0796
Textiles et tissus (Technologie)	0794

PSYCHOLOGIE

Généralités	0621
Personnalité	0625
Psychobiologie	0349
Psychologie clinique	0622
Psychologie du comportement	0384
Psychologie du développement	0620
Psychologie expérimentale	0623
Psychologie industrielle	0624
Psychologie physiologique	0989
Psychologie sociale	0451
Psychométrie	0632



Name _____

Dissertation Abstracts International is arranged by broad, general subject categories. Please select the one subject which most nearly describes the content of your dissertation. Enter the corresponding four-digit code in the spaces provided.

--	--	--	--

U·M·I

SUBJECT TERM

SUBJECT CODE

Subject Categories

THE HUMANITIES AND SOCIAL SCIENCES

COMMUNICATIONS AND THE ARTS

Architecture 0729
Art History 0377
Cinema 0900
Dance 0378
Fine Arts 0357
Information Science 0723
Journalism 0391
Library Science 0399
Mass Communications 0708
Music 0413
Speech Communication 0459
Theater 0465

EDUCATION

General 0515
Administration 0514
Adult and Continuing 0516
Agricultural 0517
Art 0273
Bilingual and Multicultural 0282
Business 0688
Community College 0275
Curriculum and Instruction 0727
Early Childhood 0518
Elementary 0524
Finance 0277
Guidance and Counseling 0519
Health 0680
Higher 0745
History of 0520
Home Economics 0278
Industrial 0521
Language and Literature 0279
Mathematics 0280
Music 0522
Philosophy of 0998
Physical 0523

Psychology 0525
Reading 0535
Religious 0527
Sciences 0714
Secondary 0533
Social Sciences 0534
Sociology of 0340
Special 0529
Teacher Training 0530
Technology 0710
Tests and Measurements 0288
Vocational 0747

LANGUAGE, LITERATURE AND LINGUISTICS

Language 0679
 General 0289
 Ancient 0290
 Linguistics 0291
 Modern 0291
Literature 0401
 General 0294
 Classical 0295
 Comparative 0297
 Medieval 0298
 Modern 0316
 African 0591
 American 0305
 Asian 0352
 Canadian (English) 0355
 Canadian (French) 0593
 English 0311
 Germanic 0312
 Latin American 0315
 Middle Eastern 0313
 Romance 0314
 Slavic and East European 0314

PHILOSOPHY, RELIGION AND THEOLOGY

Philosophy 0422
Religion 0318
 General 0321
 Biblical Studies 0319
 Clergy 0320
 History of 0322
 Philosophy of 0469
Theology 0323

SOCIAL SCIENCES

American Studies 0323
Anthropology 0324
 Archaeology 0326
 Cultural 0327
 Physical 0310
Business Administration 0272
 General 0770
 Banking 0454
 Management 0338
 Marketing 0385
Canadian Studies 0501
Economics 0503
 General 0505
 Agricultural 0508
 Commerce-Business 0509
 Finance 0510
 History 0511
 Labor 0358
 Theory 0366
Folklore 0351
Geography 0578
Gerontology 0578
History 0578
 General 0578

Ancient 0579
Medieval 0581
Modern 0582
Black 0328
African 0331
Asia, Australia and Oceania 0332
Canadian 0334
European 0335
Latin American 0336
Middle Eastern 0333
United States 0337
History of Science 0585
Law 0398
Political Science 0615
 General 0616
 International Law and Relations 0617
 Public Administration 0814
Recreation 0452
Social Work 0626
Sociology 0627
 General 0938
 Criminology and Penology 0631
 Demography 0628
 Ethnic and Racial Studies 0629
 Individual and Family Studies 0630
 Industrial and Labor Relations 0700
 Public and Social Welfare 0344
 Social Structure and Development 0709
 Theory and Methods 0999
Transportation 0453
Urban and Regional Planning 0453
Women's Studies 0453

THE SCIENCES AND ENGINEERING

BIOLOGICAL SCIENCES

Agriculture 0473
 General 0285
 Agronomy 0475
 Animal Culture and Nutrition 0476
 Animal Pathology 0359
 Food Science and Technology 0478
 Forestry and Wildlife 0479
 Plant Culture 0480
 Plant Pathology 0817
 Plant Physiology 0777
 Range Management 0746
 Wood Technology 0306
Biology 0287
 General 0308
 Anatomy 0309
 Biostatistics 0379
 Botany 0329
 Cell 0353
 Ecology 0369
 Entomology 0793
 Genetics 0410
 Limnology 0307
 Microbiology 0317
 Molecular 0416
 Neuroscience 0433
 Oceanography 0821
 Physiology 0778
 Radiation 0472
 Veterinary Science 0786
 Zoology 0760
Biophysics 0786
 General 0760
 Medical 0760

EARTH SCIENCES

Biogeochemistry 0425
Geochemistry 0996

Geodesy 0370
Geology 0372
Geophysics 0373
Hydrology 0388
Mineralogy 0411
Paleobotany 0345
Paleoecology 0426
Paleontology 0418
Paleozoology 0985
Palynology 0427
Physical Geography 0368
Physical Oceanography 0415

HEALTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Environmental Sciences 0768
Health Sciences 0566
 General 0300
 Audiology 0992
 Chemotherapy 0567
 Dentistry 0350
 Education 0769
 Hospital Management 0758
 Human Development 0982
 Immunology 0564
 Medicine and Surgery 0347
 Mental Health 0569
 Nursing 0570
 Nutrition 0380
 Obstetrics and Gynecology 0354
 Occupational Health and Therapy 0381
 Ophthalmology 0571
 Pathology 0419
 Pharmacology 0572
 Pharmacy 0382
 Physical Therapy 0573
 Public Health 0574
 Radiology 0575
 Recreation 0575

Speech Pathology 0460
Toxicology 0383
Home Economics 0386

PHYSICAL SCIENCES

Pure Sciences

Chemistry 0485
 General 0749
 Agricultural 0486
 Analytical 0487
 Biochemistry 0488
 Inorganic 0738
 Nuclear 0490
 Organic 0491
 Pharmaceutical 0494
 Physical 0495
 Polymer 0754
 Radiation 0405
Mathematics 0605
Physics 0986
 General 0606
 Acoustics 0608
 Astronomy and Astrophysics 0748
 Atmospheric Science 0607
 Atomic 0607
 Electronics and Electricity 0798
 Elementary Particles and High Energy 0759
 Fluid and Plasma 0609
 Molecular 0610
 Nuclear 0752
 Optics 0756
 Radiation 0611
 Solid State 0463
Statistics 0346
Applied Mechanics 0984
Computer Science 0984

Engineering 0537
 General 0538
 Aerospace 0539
 Agricultural 0540
 Automotive 0541
 Biomedical 0542
 Chemical 0543
 Civil 0544
 Electronics and Electrical 0348
 Heat and Thermodynamics 0545
 Hydraulic 0546
 Industrial 0547
 Marine 0794
 Materials Science 0548
 Mechanical 0743
 Metallurgy 0551
 Mining 0552
 Nuclear 0549
 Packaging 0765
 Petroleum 0554
 Sanitary and Municipal 0790
 System Science 0428
Geotechnology 0994
Operations Research 0795
Plastics Technology 0994
Textile Technology 0994

PSYCHOLOGY

General 0621
Behavioral 0384
Clinical 0622
Developmental 0620
Experimental 0623
Industrial 0624
Personality 0625
Physiological 0989
Psychobiology 0349
Psychometrics 0632
Social 0451



Purification, caractérisation et clonage d'hémicellulases thermostables de la bactérie *Bacillus stearothermophilus*.

**Thèse présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke par
Madame Guylaine Talbot, Département de biochimie, en vue de l'obtention du
grade de *philosophiae doctor* (Ph. D.).**

RÉSUMÉ

Quatre hémicellulases, une mannanase, une xylanase, une galactosidase et une xylosidase, ont été produites chez la bactérie thermophile *Bacillus stearothermophilus* en incubant le bacille dans un milieu minimal liquide dont l'hémicellulose appropriée, soit la gomme de caroube ou la xylane, a été utilisée comme source de carbone. Les hémicellulases ont été produites en phase post-stationnaire. La production maximale d'activité de la mannanase est de deux jours, de six jours pour celle de la galactosidase et de cinq jours pour celle des xylanase et xylosidase. Les quatre activités retrouvées dans le milieu de culture ont été purifiées à homogénéité.

Les étapes de purification ont fait appel à des techniques de chromatographie à échange d'ions et à interactions hydrophobes, de chromatofocalisation et de filtration sur gel. La mannanase a une activité spécifique de 100 U/mg. Sa masse moléculaire est de 73 kdaltons et elle est dimérique (162 kdaltons). La galactosidase a une activité spécifique est de 160 U/mg et a une masse moléculaire apparente de 82 kdaltons. Sa migration sur

gel de polyacrylamide sous conditions non réductrices et non dénaturantes montre qu'elle est formée de trois sous-unités. La xylanase a une activité spécifique de 250 U/mg et a une masse moléculaire de 41 kdaltons. La xylosidase a une activité spécifique de 30 U/mg et une masse moléculaire de 75 kdaltons.

La mannanase et la galactosidase ont été caractérisées. Le pH optimal de ces protéines est de 7 à 7.5. La thermostabilité des protéines purifiées a aussi été testée. La mannanase est stable durant au moins 24 heures à 65°C et perd moins de 10% d'activité à 70°C pour la même période de temps. La galactosidase est stable pendant 24 heures à 60°C et perd environ 30% d'activité à 65°C.

La mannanase a une vitesse maximale (V_{\max}) de 455 U/mg et une constante de Michaelis (K_m) de 1.5 mg/ml envers la gomme de caroube. La galactosidase a un V_{\max} de 195 U/mg et un K_m de 0.25 mM envers le p-nitro-phényl α -D-galactopyranoside. Leur spécificité est strictement reliée à leur activité particulière.

Le clonage des quatre hémicellulases a été effectué en criblant deux bibliothèques d'ADN génomique de *B. stearothermophilus*, dont le site de clonage est EcoRI ou Hind III, clonées dans *E. coli* DH5 α MCR. Le criblage s'est fait en détectant l'activité recherchée sur des boîtes de pétris contenant un substrat chromogénique. La taille des clones a été analysée ainsi que la sécrétion de protéines recombinantes par les bactéries transformées.

L'analyse de la taille des protéines recombinantes par des zymogrammes

a permis de déterminer qu'elles sont toutes de la taille qui correspond à leur homologue purifiée de *B. stearrowthermophilus*. Le taux d'expression a aussi été mesuré. La galactosidase et la xylosidase sont nettement surexprimées puisque dix fois plus d'activité est exprimée que dans la bactérie d'origine *B. stearrowthermophilus*.

Le séquençage d'un ADN cloné dans pBR322 et obtenu par criblage d'une bibliothèque d'ADN de *B. megaterium* avec des oligonucléotides déduits de la séquence N-terminale de la chitosanase purifiée dans notre laboratoire a été complété. Une étude de similarité de cette séquence avec des banques de séquences (GenBank) a permis d'identifier une homologie de 84% au niveau des acides aminés avec une cellulase de *Bacillus* sp. KSM-330. Cette homologie se retrouve strictement au niveau des acides aminés faisant partie de la protéine mature. Les 49 premiers acides aminés constituant le peptide signal de sécrétion sont spécifiques à ce clone et la séquence d'ADN correspondante se retrouve également au niveau de l'ADN génomique, tel que démontré par amplification *in vitro* de la région en question.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES ILLUSTRATIONS	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	X
RÉSUMÉ	XII
1. INTRODUCTION	1
1.1. La biomasse lignocellulosique: sources et structure	2
1.2. Les bacilles : de bons producteurs d'enzymes extracellulaires ..	4
1.3. Les microorganismes dégradant l'hémicellulose	6
1.4. La dégradation enzymatique des hémicelluloses	8
1.5. L'utilisation des hémicellulases dans l'industrie	10
1.6. Les chitosanases	20
1.7. Objectifs et stratégies du projet	22
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	27
2.1. Induction des hémicellulases en milieu minimal	27
2.1.1. Microorganisme	27
2.1.2. Milieu minimal	27
2.1.3. Protocole	27
2.2. Dosages des activités des hémicellulases	28
2.2.1. Dosage de l'activité galactosidase	29
2.2.2. Dosage de l'activité mannanase	29
2.2.3. Dosage de l'activité xylanase	30
2.2.4. Dosage de l'activité xylosidase	31
2.3. Purification des hémicellulases	31
2.3.1. Purification de la galactosidase	31
2.3.2. Purification de la mannanase	33
2.3.3. Purification de la xylanase	34
2.3.4. Purification de la xylosidase	36
2.4. Dosage de protéines	36
2.5. Électrophorèse des gels de polyacrylamide	37
2.5.1. Gels SDS-polyacrylamide	37
2.5.2. Gels natifs de polyacrylamide	37
2.6. Caractérisation des galactosidase et mannanase	37
2.6.1. pH optimal	37
2.6.2. Spécificité	38
2.6.3. Cinétique	39
2.6.4. Thermostabilité	39

2.6.5. Mode d'action de la mannanase	40
2.6.6. Point isoélectrique (pI)	40
2.7. Construction des bibliothèques d'ADN génomique	41
2.7.1. Extraction de l'ADN génomique	41
2.7.2. Digestions partielles et purification par gradient de sucrose	41
2.7.3. Ligation et transformation	42
2.7.4. Amplification et conservation des bibliothèques d'ADN génomique	43
2.8. Criblage des bibliothèques d'ADN génomique	43
2.8.1. Criblage de l'activité galactosidase	44
2.8.2. Criblage de l'activité mannanase	44
2.8.2.1. Préparation du substrat coloré	44
2.8.2.2. Révélation des colonies positives	44
2.8.3. Criblage de l'activité xylanase	45
2.8.4. Criblage de l'activité xylosidase	45
2.9. Caractérisation des clones	46
2.9.1. Préparation de l'ADN plasmidique	46
2.9.2. Localisation de l'activité des hémicellulases	46
2.9.3. Zymogrammes des hémicellulases recombinantes	46
2.9.3.1. Zymogramme des galactosidases	46
2.9.3.2. Zymogramme des mannanases	47
2.9.3.3. Zymogramme des xylanases	47
2.9.3.4. Zymogramme des xylosidases	48
2.10. Séquençage de la partie N-terminale des hémicellulases	48
2.10.1. Transfert des protéines sur membrane PVDF	48
2.10.2. Séquençage de la partie N-terminale	49
2.10.3. Séquençage de l'ADN plasmidique	49
2.11. Sous-clonage et séquençage du gène de la chitosanase de <i>B. megaterium</i>	50
2.12. Criblage de la bibliothèque d'ADN génomique de <i>Bacillus megaterium</i> par la technique de PCR	53
2.12.1. Reconstruction de la bibliothèque d'ADN génomique	53
2.12.2. Criblage par la technique de PCR	53
3. RÉSULTATS	54
3.1. Courbe de production des hémicellulases	54
3.1.1. Sélection sur milieu solide	54
3.1.2. Induction en milieu liquide minimal	54
3.2. Purification des hémicellulases	57
3.2.1. Purification de la galactosidase	57
3.2.2. Purification de la mannanase	62
3.2.3. Purification de la xylanase	68

3.2.4. Purification de la xylosidase	70
3.3. Caractérisation de la galactosidase et de la mannanase	72
3.3.1. Masse moléculaire	72
3.3.2. pH optimal et point isoélectrique	76
3.3.3. Cinétique de la galactosidase	78
3.3.4. Cinétique de la mannanase	79
3.3.5. Spécificité de la galactosidase	80
3.3.6. Spécificité de la mannanase	81
3.3.7. Mode d'action de la mannanase	83
3.3.8. Thermostabilité de la galactosidase	84
3.3.9. Thermostabilité de la mannanase	85
3.4. Clonage des hémicellulases	86
3.4.1. Préparation de l'ADN génomique	86
3.4.2. Criblage des bibliothèques d'ADN génomique	90
3.5. Caractérisation des clones	94
3.5.1. Analyse de l'ADN plasmidique des clones	94
3.5.2. Répartition de l'activité des hémicellulases	103
3.5.3. Activités <i>in situ</i> en électrophorèse (zymogrammes)	106
3.6. Région N-terminale des mannanase et galactosidase	111
3.6.1. Séquence d'acides aminés et sondes d'ADN déduites	111
3.6.2. Séquençage des clones mannanase et galactosidase	112
3.7. Séquence du gène de la chitosanase	114
3.8. Produit de PCR de la région 5' du gène de la chitosanase	117
4. DISCUSSION	119
4.1. Production des hémicellulases	119
4.2. Purification des hémicellulases	122
4.3. Caractérisation de la galactosidase et de la mannanase	126
4.3.1. Masse moléculaire, pI et pH optimal	126
4.3.2. Cinétique: V_{max} et K_m	131
4.3.3. Thermostabilité	133
4.3.4. Spécificité et mode d'action	135
4.4. Clonage des hémicellulases	137
4.4.1. Efficacité du clonage	137
4.4.2. Avantage et désavantage de la méthode de criblage des bibliothèques d'ADN génomique	137
4.5. Caractérisation des clones	138
4.5.1. Taille des inserts d'ADN plasmidique	138
4.5.2. Répartition de l'activité des hémicellulases	139
4.5.3. Activités <i>in situ</i> en électrophorèse (zymogrammes)	141
4.5.4. Séquence N-terminale de la galactosidase et de la mannanase	142
4.6. Séquençage du gène de la chitosanase	144

4.7. Produit de PCR de la région 5' du gène de la chitosanase . . .	148
4.8. Nouveaux aspects de la recherche dans le domaine	148
4.9. Conclusion	152
REMERCIEMENTS	153
BIBLIOGRAPHIE	154

LISTE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure</u>	<u>Page</u>
1	Profil de production des activités galactosidase et mannanase. . 56
2	Chromatogrammes de la purification de la galactosidase après 2 jours d'induction. 59
3	Chromatogrammes de la purification de la galactosidase après 6 jours d'induction. 61
4	Chromatogrammes de la purification de la mannanase 64
5	Chromatogrammes de la purification de la mannanase avec colonne préparative 67
6	Chromatogrammes de la purification de la xylanase 69
7	Chromatogrammes de la purification de la xylosidase 71
8	Migration des mannanase et galactosidase en gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide 73
9	Migration des galactosidase et mannanase en gel d'électrophorèse de polyacrylamide sous conditions non réductrices et non dénaturantes 74
10	Migration des xylanase et xylosidase en gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide 75
11	pH optimal de la mannanase et de la galactosidase 77
12	Isoélectrofocalisation des galactosidase et mannanase 77

LISTE DES ILLUSTRATIONS (SUITE)

<u>Figure</u>		<u>Page</u>
13	Représentation de Lineweaver-Burke de la cinétique de la galactosidase	78
14	Représentation de Lineweaver-Burke de la cinétique de la mannanase	79
15	Chromatographie (Bio-Gel P-4) des produits d'hydrolyse de la mannanase	83
16	Thermostabilité de la galactosidase	84
17	Thermostabilité de la mannanase	85
18	ADN génomique de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	87
19	Fractionnement de l'ADN génomique par gradient de sucrose . .	88
20	Fractionnement de l'ADN génomique par gradient de sucrose . .	89
21	Test de positivité des clones galactosidases	91
22	Zones d'éclaircissement obtenues par les clones mannanases . .	92
23	Zones d'éclaircissement obtenues par les clones xylanases	92
24	Gel d'agarose de l'ADN plasmidique des clones galactosidases digéré par EcoRI	95
25	Sous-clonage d'un fragment de 4 kb codant pour une activité galactosidase: Analyse par gel d'agarose de l'ADN plasmidique d'un clone galactosidase	96
26	Gel d'agarose de l'ADN plasmidique du clone Gal1c	97

LISTE DES ILLUSTRATIONS (SUITE)

<u>Figure</u>		<u>Page</u>
27	Schéma de l'insert des clones Gal1b (A) et Gal1c (B)	98
28	Gel d'agarose de l'ADN plasmidique des clones mannanases digéré par EcoRI	100
29	Gel d'agarose de l'ADN plasmidique des clones xylanases.	101
30	Gel d'agarose de l'ADN plasmidique des clones xylosidases digéré par EcoRI	102
31	Zymogramme (A) et coloration au bleu de Coomassie (B) d'un gel de polyacrylamide non dénaturant et non réducteur pour les galactosidases	107
32	Zymogramme (A) et coloration au bleu de Coomassie (B) d'un gel de SDS-polyacrylamide pour les mannanases	108
33	Zymogramme (A) et coloration au bleu de Coomassie (B) d'un gel de polyacrylamide non dénaturant et non réducteur pour les xylanases	109
34	Zymogramme (A) et coloration au bleu de Coomassie (B) d'un gel de SDS-polyacrylamide pour les xylosidases	110
35	Séquences d'acides aminés des galactosidase et mannanases .	111

LISTE DES ILLUSTRATIONS (SUITE)

<u>Figure</u>		<u>Page</u>
36	Oligonucléotides déduits des séquences protéiques de la galactosidase et de la mannanase.	112
37	Gel de polyacrylamide-urée de séquençage par PCR des clones Gal1a, Man1, Man4 et Man7.	113
38	Séquence de nucléotides et d'acides aminés du clone pBR172 .	115
39	Amplification <i>in vitro</i> d'une région 5' du gène de la chitosanase .	118
40	Alignement de la séquence en N-terminal déduite du clone pBR172 (Séquence) avec celle de la chitosanase A purifiée (N-ter) et celle de la cellulase Endo-K (Endo-K)	146
<u>Tableau</u>		<u>Page</u>
I	Purification de la galactosidase	58
II	Purification de la galactosidase après 6 jours d'induction	60
III	Purification de la mannanase	63
IV	Purification de la mannanase avec colonne préparative	66
V	Purification de la xylanase	68
VI	Purification de la xylosidase	70
VII	Spécificité de la galactosidase	81
VIII	Spécificité de la mannanase	82
IX	Clonage des hémicellulases	93

LISTE DES ILLUSTRATIONS (SUITE)

<u>Tableau</u>		<u>Page</u>
X	Distribution de l'activité des hémicellulases	104
XI	Taux d'expression de l'activité des hémicellulases	105
XII	Caractéristiques des galactosidases	129
XIII	Caractéristiques des mannanases	130

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

BCA	acide bicinchoninique
bisTris	2-bis(2-hydroxyéthyl)amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
BSA	albumine de sérum bovin
DEAE	diéthylaminoéthyl
DNSA	acide 3,5-dinitrosalicylique
DP	degré de polymérisation
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
FPLC	"Fast Protein Liquid Chromatography"
HIC	colonne à interactions hydrophobes
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galactoside
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
K_m	constante de Michaelis-Menten
LBG	gomme de caroube ("locust bean gum")
MES	acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique
NAD	adénine nicotinamide dinucléotide (forme oxydée)
NADH	adénine nicotinamide dinucléotide (forme réduite)
PAGE	gel d'électrophorèse de polyacrylamide
pb	paires de bases

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES (SUITE)

PEG	polyéthylène glycol
pI	point isoélectrique
PNP	p-nitrophényl
PNPGal	p-nitrophényl α -D-galactopyranoside
PNPXyl	p-nitrophényl β -D-xylopyranoside
PVDF	difluorure de polyvinylidène
RBB	bleu de rémazol brillant ("Remazol brilliant blue")
RF	forme répliquative
rpm	révolutions par minute
SDS	dodécyl sulfate de sodium
Taq	DNA polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	acide tétrachloroacétique
Tris	tris(hydroxyméthyl) aminomethane
V _{max}	vitesse maximale
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside

RÉSUMÉ

Quatre hémicellulases, une mannanase, une xylanase, une galactosidase et une xylosidase, ont été produites chez la bactérie thermophile *Bacillus stearothermophilus* en incubant le bacille dans un milieu minimal liquide dont l'hémicellulose appropriée, soit la gomme de caroube ou la xylane, a été utilisée comme source de carbone. Les hémicellulases ont été produites en phase post-stationnaire. La production maximale d'activité de la mannanase est de deux jours, de six jours pour celle de la galactosidase et de cinq jours pour celle des xylanase et xylosidase. Les quatre activités retrouvées dans le milieu de culture ont été purifiées à homogénéité.

Les étapes de purification ont fait appel à des techniques de chromatographie à échange d'ions et à interactions hydrophobes, de chromatofocalisation et de filtration sur gel. La mannanase a une activité spécifique de 100 U/mg. Sa masse moléculaire est de 73 kdaltons et elle est dimérique (162 kdaltons). La galactosidase a une activité spécifique est de 160 U/mg et a une masse moléculaire apparente de 82 kdaltons. Sa migration sur gel de polyacrylamide sous conditions non réductrices et non dénaturantes montre qu'elle est formée de trois sous-unités. La xylanase a une activité spécifique de 250 U/mg et a une masse moléculaire de 41 kdaltons. La xylosidase a une activité spécifique de 30 U/mg et une masse moléculaire de 75 kdaltons.

La mannanase et la galactosidase ont été caractérisées. Le pH optimal de ces protéines est de 7 à 7.5. La thermostabilité des protéines purifiées a aussi été

testée. La mannanase est stable durant au moins 24 heures à 65°C et perd moins de 10% d'activité à 70°C pour la même période de temps. La galactosidase est stable pendant 24 heures à 60°C et perd environ 30% d'activité à 65°C.

La mannanase a une vitesse maximale (V_{\max}) de 455 U/mg et une constante de Michaelis (K_m) de 1.5 mg/ml envers la gomme de caroube. La galactosidase a un V_{\max} de 195 U/mg et un K_m de 0.25 mM envers le *p*-nitro-phényl α -D-galactopyranoside. Leur spécificité est strictement liée à leur activité particulière.

Le clonage des quatre hémicellulases a été effectué en criblant deux bibliothèques d'ADN génomique de *B. stearothermophilus*, dont le site de clonage est EcoRI ou Hind III, clonées dans *E. coli* DH5 α MCR. Le criblage s'est fait en détectant l'activité recherchée sur des boîtes de pétris contenant un substrat chromogénique. La taille des clones a été analysée ainsi que la sécrétion de protéines recombinantes par les bactéries transformées.

L'analyse de la taille des protéines recombinantes par des zymogrammes a permis de déterminer qu'elles sont toutes de la taille qui correspond à leur homologue purifiée de *B. stearothermophilus*. Le taux d'expression a aussi été mesuré. La galactosidase et la xylosidase sont nettement surexprimées puisque dix fois plus d'activité est exprimée que dans la bactérie d'origine *B. stearothermophilus*.

Le séquençage d'un ADN cloné dans pBR322 et obtenu par criblage d'une

bibliothèque d'ADN de *B. megaterium* avec des oligonucléotides déduits de la séquence N-terminale de la chitosanase purifiée dans notre laboratoire a été complété. Une étude de similarité de cette séquence avec des banques de séquences (GenBank) a permis d'identifier une homologie de 84% au niveau des acides aminés avec une cellulase de *Bacillus* sp. KSM-330. Cette homologie se retrouve strictement au niveau des acides aminés faisant partie de la protéine mature. Les 49 premiers acides aminés constituant le peptide signal de sécrétion sont spécifiques à ce clone et la séquence d'ADN correspondante se retrouve également au niveau de l'ADN génomique, tel que démontré par amplification *in vitro* de la région en question.

1. INTRODUCTION

La lignocellulose est une biomasse à potentiels d'utilisation et de transformation très élevés. Elle se retrouve chez tous les végétaux, ces derniers étant la matière première utilisée par les industries papetières, pour la transformation en aliments ou dans le domaine de l'agriculture. Tous ces procédés créent des déchets qui s'accumulent ou qui sont brûlés mais qui pourraient être recyclés afin d'atténuer le problème de protection de l'environnement (Khuad et Singh, 1993).

Les galactomannanases sont des enzymes décrites depuis le début de ce siècle. Elles ont d'abord été décelées dans les sucs gastriques d'invertébrés (Bierry et Giaja, 1912) et chez les plantes puis dans le rumen des ruminants (Williams et Doetsch, 1960). L'activité était simplement mesurée par la diminution de la viscosité des substrats. Dans les années '60, les polysaccharases ainsi nommées étaient étudiées pour connaître leur mode d'action en vue de déterminer les structures d'hétéropolymères de plantes. En particulier, les travaux de Reese et Shibata (1965) portant sur l'induction en présence de substrats et le mode d'action des mannanases et galactosidases (qui contaminaient les préparations de mannanases) fongiques ont apporté des éléments aux questions de l'époque. De quelle façon l'action de la mannanase est affectée par la présence d'un résidu qui s'embranché? Est-ce que la mannanase hydrolyse avant l'enzyme qui enlève ce résidu? Les sucres réducteurs étaient dosés de façon colorimétrique avec l'acide dinitrosalicylique

(DNS) et les produits d'hydrolyse étaient analysés par chromatographie sur papier. Quelques réponses ont été apportées. Le mode d'action et la caractérisation de chaque nouvelle protéine isolée et purifiée de diverses sources (surtout de microorganismes bactériens ou fongiques ou de plantes) apportent des éléments de plus vers la compréhension du synergisme qui existe entre les diverses enzymes hydrolysant un polymère aussi hétérogène que l'hémicellulose.

1.1. La biomasse lignocellulosique: sources et structure

Le terme lignocellulose est employé pour désigner la cellulose, l'hémicellulose et la lignine qui sont les principaux constituants de la paroi cellulaire des cellules de plantes supérieures. La cellulose qui est la plus abondante est un long homopolymère pouvant avoir jusqu'à 14 000 résidus glucoses reliés entre eux par des liens glycosidiques β -1,4. Elle sert de support aux cellules végétales et est insoluble dans l'eau. La cellulose adopte une conformation ressemblant à un ruban et forme des fibrilles qui sont associées à l'hémicellulose et la lignine (Coughlan, 1985).

La lignine et l'hémicellulose ne sont pas aussi bien définies que la cellulose. Les différents types d'hémicellulose sont des hétéropolymères de sucres variés (par exemple, L-arabinose, D-galactose, D-mannose et D-xylose) qui ont un degré de polymérisation variable. Elles peuvent être linéaires ou réticulées et les résidus saccharidiques peuvent être substitués. Les hémicelluloses sont classifiées selon le type de sucre qu'elles renferment au niveau de la chaîne

principale. Ainsi, on y retrouve des arabinogalactanes, des mannanes et des xylanes (Khuad et Singh, 1993).

Les hémicelluloses les plus étudiées sont les hétéromannanes et les hétéroxylanes. Ces polysaccharides sont les constituants hémicellulosiques majeurs des bois durs pour les hétéroxylanes et ceux des bois mous et des graines des légumineuses pour les hétéromannanes (McCleary, 1988b).

Les hétéroxylanes de plantes sont des polymères ayant des résidus xyloses liés entre eux par des liens glycosidiques β -1,4 qui forment la chaîne principale. Les glucuronoxylanes ont des résidus xyloses qui sont substitués par un acide glucuronique au carbone 2 (liens α -1,2) ou par un 4-méthyl α -D-acide glucuronique. De plus, environ 70% de ces résidus xyloses sont acétylés au carbone 2 ou 3 dans les bois durs. Pour ce qui est des arabinoglucuronoxylanes, les résidus xyloses sont substitués par des arabinofuranoses (par un lien α -1,3) et des groupements 4-méthyl α -D-acide glucuronique (Zimmermann, 1992). Les bois durs contiennent 10 à 35% de xylane principalement de type O-acétyl-(4-O-méthylglucurono)xylane (Whistler et Chen, 1991). Le xylane utilisé dans l'induction de l'expression de la xylanase et la xylosidase est un hétéroxylane isolé de l'écorce de l'avoine ("oat spelts") et commercialisé par la compagnie Sigma (St.Louis).

Les hétéromannanes, elles, ont une chaîne principale composée de résidus mannoses reliés aussi par des liens glycosidiques β -1,4. Les mannoses peuvent être substitués par des groupements α -D-galactoses (liens 1 \rightarrow 6) et être associés

avec des groupements glucoses (liens β -1,4). Le polysaccharide utilisé afin d'induire la production de mannanase et galactosidase est la gomme de caroube (LBG). Ce polysaccharide est constitué de 80% de résidus mannoses et 20% de résidus galactoses embranchés en α -1,6 sur les mannoses. La distribution des substitutions galactoses n'est pas uniforme (McCleary, 1988b). Les bois mous contiennent principalement des hémicelluloses de type glucomannane - soit environ 16% - qui sont classés selon leur degré de substitution par des résidus galactoses (Whistler et Chen, 1991).

1.2. Les bacilles : de bons producteurs d'enzymes extracellulaires

Le genre *Bacillus* est reconnu pour être un producteur de glycosidases telles les cellulases, les amylases et les xylanases. Les bacilles sécrètent aussi d'autres enzymes dont notamment des protéases et des pénicillinases (Priest, 1987). Cette source d'enzymes intéressantes pour l'industrie a été l'objet de plusieurs travaux (Bawden et al., 1987; Sharp et al., 1992). Les exoenzymes les plus souvent retrouvées et étudiées chez les bacilles sont les amylases (dégradant l'amidon) et les protéases (dégradant la caséine et utilisées dans l'industrie alimentaire ou comme additif dans les détergents). La liste des enzymes produites par les bacilles qui sont utilisées dans les procédés industriels ne cesse de s'agrandir. Notons l'importance de la glucose isomérase (ou xylose isomérase) qui convertit le glucose - obtenu par digestion de l'amidon par une amylase - en fructose, le fructose étant un sucre ayant un pouvoir sucrant plus

élevé que le glucose (Ludlow et Clark, 1991). Une amylase de *B. licheniformis* et une xylose isomérase de *B. coagulans* immobilisée, par exemple, sont utilisées industriellement à température élevée (Brock, 1986). Les exoenzymes sont en général produites à leur niveau maximal surtout en début de phase stationnaire où à ce moment, elles se transforment en spores (Sharp et al., 1992). Cependant l'expression de ces enzymes n'aurait pas de rôle dans le processus de sporulation mais serait modulée par le changement des conditions environnementales (Sundaram, 1986).

En 1984, en prenant comme exemple l' α -amylase (une enzyme dégradant l'amylose qui est un polymère de résidus glucoses formant des liens α -1,4 glycosidiques), l'équipe de Fiechter a mis en évidence le potentiel de *Bacillus stearothermophilus* en tant que bactérie productrice d'exoenzymes thermostables et ayant un potentiel d'utilisation dans des procédés industriels (Grüeninger et al., 1984). L'équipe d'Isemura (Ogasahara et al., 1970) étudiant les propriétés physico-chimiques de cette enzyme a d'ailleurs appuyé le concept, incertain à la fin des années soixante, voulant que les bactéries thermophiles possèdent des enzymes qui sont thermostables. Ce concept amené par Gaughran était en opposition avec l'hypothèse d'alors qui postulait que la viabilité à haute température pouvait être due à un remplacement rapide des protéines endommagées par la chaleur résultant en un métabolisme global non affecté (Ogasahara et al., 1970).

Le défi qui s'en suivit était alors de tenter d'expliquer les facteurs menant à la

thermostabilité d'une protéine. Beaucoup d'enzymes de bacilles thermophiles et mésophiles ont fait l'objet d'études comparatives afin de dégager des principes expliquant la thermostabilité des protéines (Ogasahara et al., 1970; Liao et al., 1986; Tomazic et Klibanov, 1988; Olsen et al., 1991; Sharp et al., 1992).

On sait maintenant qu'en général les enzymes de bactéries thermophiles sont plus stables à température élevée que les enzymes de bactéries ou organismes mésophiles. Aussi, les différences entre deux enzymes ayant la même fonction mais de thermostabilité différente sont minimales au niveau de la séquence en acides aminés. La structure native d'une protéine thermostable est donc maintenue par la contribution de plusieurs résidus d'acides aminés situés dans des régions stratégiques et non dans un seul domaine de ce polypeptide. Ainsi, la stabilisation ou la déstabilisation de la structure native d'une protéine peut être affectée par la plus petite des interactions impliquées dans le maintien de cette conformation (Dill, 1987).

1.3. Les microorganismes dégradant l'hémicellulose

Notons d'abord que d'autres organismes que les microorganismes produisent des hémicellulases. Les hémicellulases de plantes ont été détectées majoritairement au niveau des graines en germination car elles servent à dégrader les polysaccharides qui sont des réserves d'énergie. Quelques invertébrés comme le lombric, l'escargot et le crabe produisent également des hémicellulases (Dekker et Richards, 1976).

Des microorganismes pouvant dégrader les hémicelluloses ont pu être isolés à partir du sol, de fourrages, de boues usées ou d'effluents de papetières. Les bactéries qu'on y retrouve sont principalement des groupes de bacilles (genres *Bacillus*, *Clostridium*) et d'actinomycètes (comprenant les genres *Streptomyces*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Microbispora*, *Actinomadura* et *Thermomonospora*). Les bactéries qui ont été isolées du rumen des bovins ou des voies intestinales humaines, dont celles des genres *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus* et *Eubacterium*, peuvent aussi dégrader les hémicelluloses qui sont ingérés par l'organisme hôte. Des espèces de bactéries pathogènes aux plantes comme les genres *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas* et *Achromobacter*, possèdent également des hémicellulases (Zimmermann, 1992). Donc, tout microorganisme qui se retrouve à proximité des végétaux est susceptible de posséder ce type de protéines.

Des microorganismes thermophiles ont également été étudiés pour leur capacité à produire des hémicellulases. Les genres de bactéries *Thermomonospora* (Ristroph et Humphrey, 1985; Bachmann et McCarthy, 1989), *Thermotoga* (Simpson et al., 1991), *Thermoanaerobacterium* (Lee et al., 1993), *Bacillus* (Grüniger et Fietcher, 1986), *Clostridium* (Schwarz et al., 1990) ainsi que le champignon *Thermomyces lanuginosus* (Lischnig et al., 1993) et des actinomycètes (Ethier et al., 1994) sont des exemples de thermophiles qui en produisent. Les hémicellulases actives à pH alcalin sont également recherchées dans le domaine d'utilisation de ces enzymes dans des procédés de

blanchiment de la pulpe de bois (V. point 1.5.). Les bactéries productrices de telles hémicellulases sont par exemple *Bacillus circulans* VTT-E-87305 (Rättö et al., 1992), *Bacillus* sp. souche 41M-1 (Nakamura et al., 1993) et *Bacillus* sp. souche TAR-1 -qui est thermophile- (Nakamura et al., 1994) et *B. stearrowthermophilus* souche T-6 (Khasin et al., 1993).

En 1976, une revue de littérature, faite par Dekker et Richards rassemblant les données publiées sur les hémicellulases purifiées et caractérisées de l'année 1950 à l'année 1973, mentionnait alors que les hémicellulases pouvaient être induites ou produites constitutivement selon le type de microorganisme et qu'elles pouvaient également être sécrétées (Dekker et Richards, 1976). Cette revue montrait aussi que beaucoup plus de champignons microscopiques (par exemple les groupes *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*) que de bactéries produisaient des hémicellulases; ou du moins avaient été répertoriées jusqu'alors. Le grand nombre de champignons étudiés provient du fait que de plus grandes quantités d'enzymes étaient produites, donc elles étaient plus facilement détectées. Par exemple, le champignon *Schizophyllum commune* produit 200 U/ml d'activité xylanase dans le milieu extracellulaire (Jurasek et Paice, 1988).

1.4. La dégradation enzymatique des hémicelluloses

Les hémicellulases sont des glycohydrolases (EC 3.2.1) pouvant dépolymériser des polysaccharides constitués de différents sucres. A cause de la grande diversité des substrats hémicellulosiques, il existe beaucoup d'hémicellulases

ayant une spécificité plus ou moins importante pour un type de sucres, un type de liaisons glycosidiques et/ou même pour des substitutions particulières sur les sucres. Les hémicellulases ont une activité hydrolase similaire aux cellulases faisant toutes deux partie de la grande famille des glycosidases (Gilkes et al., 1991). Premièrement, les hémicellulases peuvent hydrolyser les liens glycosidiques à l'intérieur des polymères de sucres; ce sont des endo-glycanases. Deuxièmement, les hémicellulases peuvent aussi faire partie du groupe des exo-glycanases (ou exo-glycosidases) qui hydrolysent les oligosaccharides (qui sont les produits de digestion des endoglycosidases) ou les sucres substituants des polysaccharides ramifiés (en position α -1,6). Et finalement, des enzymes ne faisant pas partie de la classification des hémicellulases, des estérases, peuvent cliver les groupements acétyls, acide férulique ou p-coumarique afin de dégrader les hémicelluloses complètement.

Les enzymes pouvant hydrolyser les hémicelluloses et qui ont été décrites dans la littérature jusqu'à présent sont les suivantes: les acétylxylane estérases, les arabinofuranases, les arabinogalactanases, les galactosidases, les glucuronidases, les glucosidases, les mannanases, les mannosidases, les xylanases et les xylosidases.

Les mannanases (ou (1→4)- β -mannane mannohydrolase, endo-D-mannanase, EC 3.2.1.78) sont des enzymes pouvant hydrolyser des liens β -1,4 des unités mannopyranoses retrouvées dans les mannanes ou les galactomannanes (Dekker et Richards, 1976).

Les hémicellulases les mieux étudiées maintenant sont de loin les xylanases, vu leur grand potentiel d'utilisation dans le blanchiment de la pâte de papier (Paice et Jurasek, 1984). Les hémicellulases les moins étudiées sont les mannanases, ce qui stimula notre intérêt premier pour ces deux types d'hémicellulases. Les questions importantes dans la compréhension du mécanisme d'action des différentes hémicellulases sont les suivantes: pourquoi des glycohydrolases qui reconnaissent toutes des liens glycosidiques β -1,4 sont spécifiques aux deux sucres participants? pourquoi y a-t-il des enzymes spécifiques aux liens α et β ? Mais ce qui, en général, stimula surtout les recherches dans les années '80 sur ces enzymes a été leur potentiel d'utilisation dans le milieu industriel afin d'améliorer la qualité de la pâte, de diminuer la toxicité des effluents retrouvés dans les cours d'eau et de minimiser les coûts de production de la pâte de papier (Tremblay et Archibald, 1993).

1.5. L'utilisation des hémicellulases dans l'industrie

Les enzymes bactériennes utilisées efficacement dans un procédé industriel possèdent idéalement les caractéristiques suivantes. 1) Elles sont des protéines sécrétées qui sont stables à haute température. Comme mentionné précédemment (point 1.2.), les enzymes isolées de bactéries thermophiles ont en général une température optimale élevée (50 à 70°C) et sont donc de bonnes candidates. Les enzymes provenant de thermophiles extrêmes sont encore plus favorables. L'avantage majeur de la thermostabilité de la protéine est que le

substrat y est mieux solubilisé, est moins visqueux et est alors plus accessible à l'enzyme (surtout lorsque le substrat est un polymère). 2) Les protéines seront aussi stables et actives plus longtemps. Notons aussi que le risque de contamination par des bactéries (pathogènes ou nuisibles au procédé) est réduit en opérant à température élevée. 3) Une autre caractéristique recherchée est le bon fonctionnement de l'enzyme au pH du mélange réactionnel contenant le substrat (Herbert, 1992). Dans l'industrie papetière par exemple, les enzymes actives dans des conditions alcalines sont plus intéressantes puisque l'hémicellulose y est plus soluble (Ludlow et Clark, 1991) et que le prétraitement de la pulpe de bois Kraft se fait sous conditions fortement alcalines (Tolan et al., 1994a). Donc en résumé, les enzymes qui seront utilisées dans un bioréacteur doivent être choisies en tenant compte des contraintes physiques du mélange réactionnel.

Les hémicellulases peuvent surtout être utilisées afin d'améliorer le blanchiment de la pâte de papier Kraft. Le procédé Kraft de fabrication du papier génère des déchets toxiques comme les dioxines et les furannes polychlorés (Lee et al., 1989; Rappe, 1990). Ces produits se retrouvent dans tout l'écosystème environnant les moulins à papier et également dans les produits finaux dérivés du papier (comme le carton de lait; Rappe, 1990). Ce problème environnemental a été adressé dans les années '90 et des alternatives aux produits chimiques chlorés ont été rapportées (Liebergott et al., 1993; O'Connor et al., 1994). La pâte Kraft est maintenant traitée de manière différente: principalement, une étape

d'oxygénation a été ajoutée et le chlore est partiellement (et de plus en plus) remplacé par le dioxyde de chlore. Une étude, menée par un groupe de l'Institut de recherches sur les pâtes de papier de Pointe Claire, sur les différentes étapes alternatives de blanchiment montre que la présence de produits organochlorés et la toxicité des effluents peuvent alors être réduites de beaucoup (O'Connor et al., 1994).

Le prétraitement enzymatique de la pâte à papier par des hémicellulases diminue également la quantité de déchets nocifs puisque des quantités moins grandes de chlore sont requises (Paice et al., 1992; Tremblay et Archibald, 1993). L'hémicellulose étant le lien physique entre la lignine et la cellulose, la lignine se détache indirectement de la cellulose lorsque l'hémicellulose est dégradée, ou bien la lignine devient du moins plus accessible à l'attaque par la soude. La cellulose se retrouve donc décolorée puisque c'est la lignine qui est responsable de la couleur brunâtre de la pâte de papier et de sa fragilisation mécanique (Flandroy, 1991). Un autre avantage de l'emploi des hémicellulases dans le blanchiment de la pâte à papier est que la cellulose demeure intacte car ces enzymes (dont les préparations ne sont pas contaminées par des activités cellulases) sont spécifiques à l'hémicellulose.

De façon générale, les xylanases sont les hémicellulases ayant le plus d'effet sur le blanchiment tandis que les mannanases agissent surtout sur les pâtes produites à partir de bois mous qui contiennent principalement des glucomannanes. Les mannanases qui seront efficaces sont donc celles pouvant

dépolymériser préférentiellement les glucomannanes (Arcand et al., 1993; Paice et al., 1992). Plusieurs mannanases d'origine bactérienne (Lüthi et al., 1991; Araujo et Ward, 1990; Talbot et Sygusch, 1990; Akino et al., 1989) ou fongique (Arcand et al., 1993; Torrie et al., 1990; Ratto et Poutanen, 1988) ont été isolées, caractérisées et clonées. Quelques unes d'entre elles ont été étudiées en vue d'une utilisation possible dans le procédé de blanchiment (Lahtinen, 1994; Arcand et al., 1993; Lüthi et al., 1991; Clark et al., 1990; Torrie et al., 1990; Rattö et Poutanen, 1988).

Le titre de pionniers dans l'utilisation des hémicellulases pour blanchir la pulpe de bois revient aux finlandais Viikari et Linko (Viikari et al., 1986). Au Canada, Paice et Jurasek ont largement contribué au développement de systèmes enzymatiques de blanchiment. Les premiers travaux de recherche à être publiés sur le sujet ont été ceux de Paice et Jurasek (1984). La source de xylanases qu'ils ont utilisée a été un extrait brut du champignon *Schizophyllum commune* précipité au sulfate d'ammonium pour purifier partiellement la xylanase et éliminer l'activité cellulase présente. Ils ont démontré que les xylanases diminuent le pourcentage d'hémicellulose dans la pulpe de bois et qu'il est important de prétraiter cette pulpe avec des xylanases dépourvues d'endoglucanases sinon la pâte qui est par la suite blanchie est de moindre qualité (viscosité réduite) et elle contient plus d'hémicellulose. Les chercheurs de l'équipe de Viikari (Viikari et al., 1986), pour leur part, ont poussé l'étude en démontrant que la pulpe de bois prétraitée par des xylanases (du champignon *Aspergillus awamori*) contient moins

de lignine (est donc mieux décolorée) pour une même quantité de chlore utilisée dans le procédé de blanchiment. Depuis, les recherches dans le développement d'hémicellulases ayant les caractéristiques voulues pour le bioblanchiment ont été amorcées avec enthousiasme et popularité. Les enzymes ayant le plus de potentiel sont celles étant stables à haute température et actives en conditions alcalines (Rättö et al., 1992; Royer et Nakas, 1990).

L'équipe de l'Institut Armand-Frappier de Laval, composée principalement de Kluepfel, Morosoli et Shareck, a réalisé des travaux intéressants sur des hémicellulases de *Streptomyces lividans*. Ce champignon excrète de grandes quantités de xylanases qui sont également très actives (Morosoli et al., 1986). Trois xylanases distinctes ont été caractérisées et clonées de façon homologue (Biely et al., 1993; Shareck et al., 1991; Mondou et al., 1986). Des travaux importants sur le mode d'action de ce système xylanolytique ont aussi été réalisés de façon élégante en utilisant une panoplie d'oligosaccharides bien caractérisés comme substrat (Biely et al., 1993); afin de mieux comprendre pourquoi plusieurs xylanases (et glycohydrolases) sont produites par les microorganismes. Ces enzymes sont également testées sur des préparations industrielles grâce à une collaboration avec ICI Canada (Kluepfel, 1995). Ces xylanases sont très performantes: de l'ordre de 300U/ml et 3000 U/mg d'activité spécifique.

Le développement de procédés de blanchiment de la pâte de papier biotechnologiques utilisant des hémicellulases a été stimulé par le besoin des

compagnies de réduire la toxicité des effluents. Les premiers essais à l'échelle des papetières ont débuté en Finlande dès 1989 et au Canada, en Colombie-Britannique, en 1991 (Tolan et al., 1994a). Tolan, Dines et Olson (1994a), des chercheurs canadiens, ont récemment interrogé 42 papetières canadiennes sur l'usage des xylanases. Parmi elles, 18 ont fait des tentatives et 6 sont des utilisateurs de l'enzyme sur environ 20% de leur production. Ce qui représente 8% de la production totale au Canada. Leur rapport indique que l'avantage premier de l'utilisation des xylanases est de diminuer la quantité des produits chimiques requis. Il en découle que la toxicité des effluents est diminuée et que la pâte est moins endommagée.

Le groupe du centre de recherche en pâtes et papiers de l'Université du Québec à Trois-Rivières a récemment publié une revue sur l'application des xylanases dans le blanchiment de la pâte Kraft (Daneault et al., 1994). La xylanase, qui est spécifique aux hémicelluloses (particulièrement aux xylanes), hydrolyserait les liens glycosidiques entre les unités xylose de façon à améliorer l'accessibilité des agents blanchissants chimiques et ainsi faciliter le relâchement de la lignine. La blancheur du papier est également supérieure. Donc, l'utilisation des xylanases améliore la qualité du papier Kraft haut de gamme, les papiers fins.

Certaines xylanases employées proviennent de diverses compagnies et ont des caractéristiques variées. Des chercheurs des centres de recherche du Danemark et des États Unis de la compagnie Novo-Nordisk ont présenté, lors de

l'International Pulp Bleaching Conference en Suède en 1991, l'effet de blanchiment de deux préparations de xylanases nommées SP473 et SP406 d'origine bactérienne et fongique. Ces enzymes sont alcalotolérantes et ont été utilisées aux pH 8 et 9, à 50°C, avec succès (Pederson et al., 1991). La papetière Donohue de St-Félicien, au Québec, a rapporté l'utilisation d'une xylanase dont le nom commercial est Ecopulp X-100 (de ICI Forest Products, Mississauga, Ont.; Jean et al., 1994). Cette enzyme fonctionne dans l'échelle de pH 4.5 à 8 et à 60°C. Le groupe de recherche d'Iogen Corporation a traité, avec succès, la pâte dans le but d'améliorer l'uniformité ("shive removal") du papier. Trois xylanases ont été testées. Elles sont d'origine bactérienne et ont un pH optimal neutre et une température optimale de 50°C (Tolan et al, 1994b). Lahtinen (1994) a rapporté que l'utilisation conjointe d'une mannanase et une xylanase (à pH 5.5 et à 50°C) permet d'obtenir une pâte de papier de bois mous de bonne qualité et où le chlore élémentaire ou sous forme d'oxyde est complètement remplacé par une oxygénation et une peroxydation. La compagnie Zeneca BioProducts (Mississauga, Ont.) a commercialisé une préparation d'hémicellulases sous le nom d'Ecozyme, qui contient majoritairement une xylanase (Bernier, 1995). Il s'agit d'une xylanase de *Neocollimastix patriciarum* clonée et exprimée dans *E. coli*. Elle est fonctionnelle aux pH 5 à 9 et entre 45 et 65°C. Il existe donc présentement sur le marché des préparations d'hémicellulases intéressantes et le blanchiment du papier de façon enzymatique se fait, de façon limitée et pour produire un papier de haute qualité, à l'échelle

industrielle. Cependant, l'utilisation des xylanases serait facilitée si: 1) les enzymes étaient fonctionnelles à pH basique, afin de réduire l'ajout d'acide sulfurique utilisé pour abaisser le pH de la pâte traitée à la soude caustique, 2) les enzymes étaient plus stables, ce qui optimiserait l'utilisation de ces enzymes (Tolan et al., 1994a).

Les hémicellulases ainsi que les cellulases peuvent aussi être exploitées afin d'améliorer la digestibilité des fourrages servant de nourriture au bétail de ferme (Gilbert et Hazelwood, 1993). En effet, un prétraitement des fourrages avec de telles enzymes rend la nourriture plus accessible à la microflore du rumen. Ces enzymes peuvent aussi aider à mieux dégrader le compost servant à fertiliser les terres agricoles.

Des procédés de saccharification enzymatique peuvent être améliorés par de telles enzymes. On peut aussi envisager une digestion des déchets industriels et des eaux usées (Gilbert et Hazelwood, 1993).

Les α -galactosidases peuvent être utiles pour diminuer le taux de substitution par des résidus galactoses de la gomme de guar afin de l'utiliser aux mêmes fins que celles de la LBG qui contient moins de substituants galactoses (Roller et Dea, 1992). Dans l'industrie alimentaire, la LBG est l'agent de coagulation employé dans plusieurs procédés, dans le développement de mets hypocaloriques par exemple. Les α -galactosidases peuvent également être utilisées dans les procédés de fabrication du sucre car ces enzymes dégradent le raffinose. L'élimination du raffinose permet de meilleurs rendements pour la

cristallisation subséquente du sucrose qui est le sucre désiré (Ganter et al., 1988). Ce procédé de saccharification à partir de betteraves nécessite, tout comme les procédés de mise en pâte du bois dans l'industrie papetière, un pH non acide (à cause de l'hydrolyse acide du sucrose) et des températures de 65 à 70°C. Donc il est intéressant d'obtenir en quantité adéquate des α -galactosidases efficaces dans de telles conditions. L'équipe de Mattes (Ganter et al., 1988) a réussi d'ailleurs à cloner et produire une α -galactosidase de la souche KVE39 de *B. stearothermophilus* ayant les caractéristiques recherchées: thermostabilité à 65°C, active en présence de sucrose et à pH neutre. Cependant, l'enzyme n'a pas été purifiée ni caractérisée.

La limite d'utilisation des hémicellulases procaryotiques intéressantes est causée par divers facteurs. La présence de protéases et hydrolases dans les préparations d'hémicellulases sécrétées par les bacilles en est un exemple. Aussi, les taux de production par les microorganismes naturels sont souvent faibles. Les hémicelluloses étant des polymères de sucres très variés, il faut une combinaison d'hémicellulases spécifiques pouvant donner comme produit de digestion des monosaccharides (dans le cas de la saccharification par exemple) ou pour que ce soit suffisamment hydrolysé pour faciliter la libération de la lignine d'après la cellulose (dans le cas du bioblanchiment de la pâte à papier). Les microorganismes mentionnés ci-haut possèdent la machinerie enzymatique plus ou moins complète permettant la dégradation de la biomasse. Mais ce processus de dégradation est lent et peu efficace; heureusement pour nos forêts! De plus,

l'expression des différentes hémicellulases est modulée selon l'environnement dans lequel la bactérie évolue. Par exemple, les endo-glycanases sont de façon générale induites et sécrétées par des microorganismes mis en présence d'hémicellulose.

Dans un procédé de dépolymérisation de l'hémicellulose, beaucoup de paramètres entrent en ligne de compte et sont à optimiser: les types d'hémicellulases à utiliser (afin de dépolymériser au degré voulu et il faut aussi considérer les combinaisons d'enzymes qui peuvent s'inhiber entre elles), les concentrations de substrat et de produits (car il peut y avoir inhibition), le pH (utiliser des enzymes alcalophiles est avantageux dans le cas d'un procédé de prétraitement pour le bioblanchiment car le pulpage se fait à pH basique), la température (tenter d'opérer à la plus haute température permise par les enzymes sans les thermoinactiver car la viscosité des substrats polymériques est diminuée), les concentrations de métaux qui peuvent influencer l'activité enzymatique, etc.

Le défi à relever pour obtenir une utilisation adéquate de plusieurs hémicellulases agissant en synergisme est de taille. C'est pourquoi il est important de comprendre comment ces enzymes clivent leurs substrats du point de vue moléculaire. Des études tridimensionnelles de ces hémicellulases ont donc été récemment amorcées afin d'élucider la relation structure/fonction et de tenter de modeler des enzymes plus polyvalentes et ayant les caractéristiques opportunes à l'application désirée (Derewenda et al., 1994, Torronen et al., 1994).

1.6. Les chitosanases

Les chitosanases sont des enzymes qui hydrolysent le chitosane, un polymère qui est constitué de résidus N-acétyl-glucosamines et glucosamines reliés entre eux par des liens glycosidiques β -1,4. Dans la nature, le chitosane, composé de résidus glucosamine partiellement acétylés, se retrouve en faible abondance et uniquement dans la paroi cellulaire de quelques champignons (Trudel et Asselin, 1990). Toutefois, il est possible d'en obtenir de plus grandes quantités en déacétylant chimiquement (traitement dans 50% NaOH) un polymère de N-acétyl glucosamine, la chitine, afin de le transformer en chitosane. Des travaux de recherche en vue de développer une alternative moins coûteuse et produisant du chitosane ayant un degré de déacétylation contrôlable ont été entrepris avec succès par les équipes des Drs Sygusch (département de biochimie, faculté de médecine) et Chornet (département de génie chimique, faculté des sciences appliquées) de l'Université de Sherbrooke (Pelletier et al., 1990). Simultanément, une étude réalisée par Dre Pelletier afin d'obtenir une source de chitosanases pouvant produire du chitosane de divers degrés de polymérisation a été réalisée. La bactérie *Bacillus megaterium* s'est avérée productrice de chitosanases en criblant un échantillonnage de bactéries retrouvées à la surface du sol et ces protéines ont été purifiées et caractérisées (Pelletier et Sygusch, 1990). Des trois chitosanases purifiées, la chitosanase A ainsi qu'une chitinase commerciale ont servi à déterminer le degré de déacétylation de la chitine traitée de façon thermo-mécano-chimique (Pelletier et al., 1990). De cette façon, le procédé peut

être analysé enzymatiquement. Cependant malgré que ce procédé permette de contrôler le degré de déacétylation, la quantité de chitosanases produite par *B. megaterium* est insuffisante (Pelletier, 1991). Le clonage et la possibilité de surexprimer une chitosanase recombinante était requis. Jusqu'à maintenant peu de chitosanases ont été clonées et ce, depuis peu. La première chitosanase à être clonée et exprimée est celle de l'actinomycète *Kitasatosporia* (Fink et al., 1991). La seconde chitosanase clonée provient de *Bacillus circulans* (Ando et al., 1992).

Le chitosane est un polymère ayant des propriétés diverses. C'est surtout au Japon mais aussi aux Etats Unis que le chitosane est employé comme additif dans plusieurs procédés industriels (Hirano, 1989; Sandford, 1989). Son pouvoir hydratant lui confère un attrait dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Pelletier et al., 1990). Un film de chitosane appliqué sur une blessure ouverte ou une brûlure de la peau amène une guérison plus rapide. C'est surtout le cas lorsque du chitosane de faible masse moléculaire est utilisé (Allan et al., 1984). Ces oligomères de chitosane sont aussi des antifongiques et antibactériens plus efficaces que le chitosane non hydrolysé (Uchida et al., 1989). D'où l'importance d'obtenir un chitosane de masse moléculaire plus faible en le digérant par des chitosanases.

1.7. Objectifs et stratégies du projet

L'objectif premier était d'induire la production de mannanases dans des bactéries thermophiles extrêmes. Mais suite à notre insuccès avec les bactéries *Thermus aquaticus* et *Sulfolobus solfaraticus*, nous nous sommes penchés vers *Bacillus stearothermophilus*. Cette bactérie pouvant croître à 55°C, les enzymes isolées pouvaient montrer une thermostabilité intéressante qui pourrait par la suite être améliorée par mutagénèse dirigée. Donc, les objectifs qui résument le projet de thèse sont les suivants.

- 1) Rechercher une souche bactérienne capable de produire des hémicellulases. Isoler ces enzymes et les purifier jusqu'à homogénéité.
- 2) Caractériser ces hémicellulases en déterminant la masse moléculaire, le pI, la spécificité, le mode d'action, leurs paramètres cinétiques (vitesse maximale (V_{\max}) et constante de Michaelis (K_m)).
- 3) Cloner les gènes encodant des hémicellulases.
- 4) Exprimer ces protéines recombinantes.
- 5) Séquencer un gène codant pour une chitosanase de *Bacillus megaterium*.

Donc, ce projet de recherche a consisté principalement à produire des hémicellulases qui pourront par la suite être modifiées par ingénierie des protéines. C'est-à-dire que la structure tridimensionnelle des protéines recombinantes pourra être élucidée (à partir de cristaux, par cristallographie); et la spécificité, le mode d'action et la thermostabilité pourront être étudiés.

Les stratégies qui ont été développées sont celles-ci:

1) Choix de la bactérie: afin de produire des hémicellulases thermostables avec succès, une espèce de bactérie qui vit naturellement près de la biomasse (source d'hémicellulose) a été choisie. La bactérie *Bacillus stearothermophilus* s'avéra donc une bonne candidate à cette fin et de plus elle est thermophile.

2) Production des hémicellulases: la bactérie thermophile *B. stearothermophilus* a été mise en culture dans un milieu minimal contenant le substrat approprié comme source de carbone.

3) Les hémicellulases produites ont été purifiées: les méthodes de purification de la galactosidase et de la mannanase ont été le fractionnement par sulfate d'ammonium, la chromatographie par gel de filtration, la chromatographie sur F.P.L.C. ("Fast Protein Liquid Chromatography") en utilisant des colonnes d'échangeurs d'ions (analytiques dans un premier temps, puis ensuite aussi préparatives), des colonnes à interactions hydrophobes, une chromatofocalisation et une filtration sur gel.

4) Caractérisation des mannanase et galactosidase: Les mannanases et galactosidase purifiées ont été caractérisées selon leur masse moléculaire sous conditions non dénaturantes et non réductrices ainsi que sous conditions dénaturantes et réductrices, leur point isoélectrique, leurs constantes cinétiques (vitesse maximale et constante de Michaelis) et leur spécificité. Le degré de polymérisation des oligosaccharides produits par la mannanase a aussi été

analysé par filtration sur gel.

5) Clonage des hémicellulases: afin de cloner les hémicellulases, deux bibliothèques d'ADN génomique de *B. stearothermophilus* ont été créées. Ces bibliothèques d'ADN génomique (sites *EcoRI* et *HindIII*), dont les produits de gènes ont été exprimés dans *E. coli*, ont été criblées par détection de l'activité de l'hémicellulase recherchée en utilisant un substrat chromogénique. Les quatre types d'hémicellulases purifiées et caractérisées dans notre laboratoire, soient la galactosidase, la mannanase, la xylanase et la xylosidase, ont été retrouvées. Cette méthode a été privilégiée à celle où des sondes (dédites de la séquence N-terminale des protéines) sont utilisées puisqu'alors, il n'avait pas encore été possible d'obtenir une séquence N-terminale pour la galactosidase et la mannanase (la technique de microséquençage qui nécessite une plus petite quantité de protéines (10 à 100 pmol) n'étant pas encore à notre portée).

6) Caractérisation des clones et des hémicellulases recombinantes: afin de vérifier la validité des clones obtenus, une préparation d'ADN plasmidique suivie d'une digestion au site de clonage ont été effectuées. La façon la plus convaincante de valider l'identité du clone (c'est-à-dire d'être certain que l'insert code pour une hémicellulase provenant de *B. stearothermophilus*) est de faire correspondre la séquence protéique N-terminale à la séquence déduite de l'insert. C'est donc pourquoi les xylanase et xylosidase ont aussi été purifiées. Cependant les seules protéines transférées sur membrane PVDF qui ont pu être séquencées sont la galactosidase et la mannanase (soit parce que les autres

protéines ne se sont pas désorbées de la membrane PVDF ou parce que le N-terminal est bloqué).

Les protéines recombinantes exprimées dans *E. coli* et les hémicellulases purifiées à partir de la bactérie d'origine, *B. stearothermophilus*, ont été analysées par des zymogrammes. Le taux d'expression a aussi été déterminé, ainsi que le taux de sécrétion.

7) Séquençage du gène codant pour une chitosanase de *B. megaterium*: un gène codant pour une chitosanase que nous avons au laboratoire a été entièrement séquencé. Puisqu'aucun gène de chitosanase n'avait été rapporté dans la littérature, l'intérêt était grand. Ce clone a été obtenu par criblage d'une bibliothèque d'ADN génomique de *B. megaterium* (Pelletier, 1991). Le séquençage s'est fait en sous-clonant dans le phage M13 série mp afin d'obtenir de l'ADN simple brin.

Des recherches d'homologie de cette séquence nucléotidique et de la séquence d'acides aminés traduite ont été faites. L'analyse a montré une forte homologie avec une cellulase d'une souche de *Bacillus* pour la région codant la protéine mature du gène et non en amont (dans la séquence signal). Nous avons voulu vérifier si cette séquence codante se retrouve vraiment en 3' de la région non homologue au niveau de l'ADN génomique de *B. megaterium* et qu'elle ne résulte pas d'un artefact pouvant se produire durant l'étape de ligation des fragments d'ADN génomique digéré par Sau3A au plasmide pBR322. La technique utilisée est l'amplification *in vitro* (PCR). Un produit de PCR de la taille

attendue a été obtenu avec des oligos spécifiques à la séquence chitosanase: un dans la région 5' qui n'est pas homologue à la séquence de la cellulase et l'autre oligonucléotide se situant dans la région homologue à la séquence de la cellulase.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Induction des hémicellulases en milieu minimal

2.1.1. Microorganisme

La bactérie *Bacillus stearothermophilus* NCA 2184 a été achetée de la compagnie ATCC ("American Type Culture Collection", Rockville, MD).

2.1.2. Milieu minimal

Le milieu minimal utilisé pour produire les hémicellulases était celui développé pour *B. stearothermophilus* par l'équipe d'Amelunxen (Rowe et al., 1975) qui contenait les minéraux, les vitamines et une source d'azote essentiels. Cependant les sources de carbone utilisées étaient 1% (p/v) de substrat (gomme de caroube ou xylane d'avoine) et 0.1% (p/v) d'extraits de levure. Ces substrats ont été achetés de la compagnie Sigma (St. Louis, MO).

2.1.3. Protocole

Les bactéries amenées en phase stationnaire par une croissance de 20 heures dans un milieu liquide riche #266 de la compagnie ATCC ont été étalées sur milieu solide minimal (Rowe et al., 1975) avec le substrat à 1% (p/v) comme source de carbone. Ce pétri a été incubé durant quelques jours à 50°C, jusqu'à ce que des colonies isolées soient visibles.

Une colonie a été sélectionnée et transférée dans un milieu liquide riche (ATCC #266) à 55°C pendant 3 jours, en augmentant le volume du milieu de croissance d'un facteur 10 à chaque jour. Ainsi après le premier jour d'incubation, la culture a été transférée dans 30 ml de milieu, au deuxième jour, elle a été transférée dans 300 ml de milieu et le troisième jour dans 3 litres de milieu ATCC #266. Les bactéries ont été alors récoltées en centrifugeant à 10,000 x g pendant 20 minutes.

Le culot de bactéries a été resuspendu dans 1/2 volume (1.5 l) de milieu minimal liquide ayant 1% (p/v) de substrat comme source de carbone. Cette suspension bactérienne a été incubée à 55°C, sous agitation à 200 rpm, durant 2 jours pour produire simultanément la mannanase et la galactosidase et durant 5 jours pour produire la xylanase et la xylosidase. Des aliquotes ont été prélevées durant l'induction afin de mesurer les activités des enzymes présentes comme décrit plus loin. L'activité de l'aldolase retrouvée dans le milieu de culture a été mesurée par un essai couplé à la triose phosphate isomérase et à la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase. Cette dernière enzyme utilise le NAD⁺ pour produire du NADH lequel absorbe à 340 nm. Le protocole mis au point par Chantal de Montigny du laboratoire a été utilisé (de Montigny, 1992).

2.2. Dosages des activités des hémicellulases

Le dosage des activités des galactosidase et xylosidase a été mesuré en utilisant des substrats synthétiques spécifiques, soient le p-nitrophényl α -D-

galactopyranoside (PNPGal) et le p -nitrophényl β -D-xylanopyranoside (PNPXyl). Le produit des réactions enzymatiques, le p -nitrophénol (PNP), a une absorbance maximale à 405 nm.

Les activités des mannanase et xylanase ont été estimées en dosant les sucres réducteurs produits par la méthode utilisant l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) (Bernfeld, 1955).

2.2.1. Dosage de l'activité galactosidase

Chaque essai contenait 50 μ l de PNPGal 20 mM, 100 μ l de tampon KH_2PO_4 pH 7.0 et la dilution d'enzyme voulue dans un volume total de 1 ml. Le temps de réaction débute lors de l'ajout du substrat dans le mélange préchauffé à 55° C. La réaction est stoppée par ajout de 30 μ l de NaOH 2N puis l'échantillon est aussitôt plongé dans l'eau glacée afin d'éviter une hydrolyse non spécifique du substrat par le NaOH, jusqu'au moment de la lecture au spectrophotomètre à 405 nm.

Une unité de l'activité galactosidase est définie comme étant la quantité d'enzyme requise pour produire 1 μ mol de PNP par minute sous ces conditions.

2.2.2. Dosage de l'activité mannanase

L'essai typique contenait 50 μ l de tampon KH_2PO_4 500 mM pH 6.5, 250 μ l de la dilution d'enzyme voulue; puis ce mélange était préincubé à 55°C pour quelques minutes. La réaction enzymatique est amorcée par l'ajout de 200 μ l

d'une suspension de gomme de caroube (LBG) 0.5% (p/v) préchauffée à 55°C. L'addition de 500 µl de la solution DNSA termine la réaction enzymatique. L'échantillon est ensuite plongé dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes au même moment que des échantillons contenant des quantités de mannose connues pour fin de standardisation. Les échantillons ont par la suite été dilués avec 4 ml d'eau puis leur densité optique a été déterminée par spectrophotométrie à 510 nm (Bernfeld, 1955).

Une unité d'activité mannanase correspond à l'équivalent de 1 µmole de mannose libérée par minute dans ces conditions.

2.2.3. Dosage de l'activité xylanase

Un mélange contenant 100 µl de tampon phosphate 200 mM pH 7.0 et 200 µl de la quantité d'enzyme voulue a été incubé à 55°C. L'ajout de 200 µl de xylane d'avoine 0.5% (p/v) débute la réaction. L'addition de 500 µl de la solution DNSA arrête la réaction enzymatique. L'échantillon est ensuite plongé dans de l'eau bouillante pour 5 minutes au même moment que des échantillons contenant des quantités de xylose connues pour fin de standardisation. Les échantillons ont par la suite été dilués avec 4 ml d'eau puis leur densité optique a été déterminée par spectrophotométrie à 510 nm (Bernfeld, 1955).

Une unité d'activité xylanase correspond à l'équivalent de 1 µmole de xylose libérée par minute dans ces conditions.

2.2.4. Dosage de l'activité xylosidase

L'activité xylosidase a été, tout comme pour la galactosidase, évaluée par la production de PNP. L'échantillon, de volume final de 1 ml, contenait 100 µl de PNPXyl 12 mM qui a été ajouté à 200 µl de KH_2PO_4 200 mM, pH 6.0 et 700 µl d'enzyme de dilution voulue préincubés à 55° C. Après 2 à 5 minutes à cette température, 30 µl de NaOH 2N ont été ajoutés afin de mettre fin à la réaction enzymatique. L'échantillon était aussitôt mis dans de l'eau glacée jusqu'au moment de mesurer la densité optique à 405 nm par spectrophotométrie.

Une unité de l'activité β -xylosidase est définie comme étant la quantité d'enzyme requise pour produire 1 µmol de PNP par minute sous ces conditions.

2.3. Purification des hémicellulases

Un appareil de purification de protéines par chromatographie, "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC) de la compagnie Pharmacia, a été utilisé pour la purification de ces quatre hémicellulases. Seules les colonnes DEAE-Sephadex et Sephacryl S-200 n'ont pas été couplées à ce système.

2.3.1. Purification de la galactosidase

Les bactéries ont été d'abord éliminées en centrifugeant à 12,000 x g durant 30 minutes à 4°C. Le surnageant de cette centrifugation a ensuite été amené à 20% de saturation en sulfate d'ammonium, centrifugé à 40,000 x g pendant 20 minutes et le surnageant obtenu était amené à 50% de saturation en

sulfate d'ammonium. L'activité de la galactosidase a été retrouvée dans le culot formé en centrifugeant à 45,000 x g durant 30 minutes.

Ce culot a été dissout dans 20 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6.5). puis appliqué sur une colonne de chromatographie par filtration sur gel Sephacryl S-200 (26 mm x 90 cm, Pharmacia). Le tampon d'élution était composé de 100 mM KH_2PO_4 et 150 mM NaCl pH 6.5.

Les fractions actives recueillies ont été regroupées, dialysées (contre le tampon 20 mM bis-Tris pH 6.0) et ensuite soumises à une purification sur échangeur d'anions en utilisant la colonne MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) équilibrée avec le tampon 20 mM Bis-Tris pH 6.0. La galactosidase a été éluée en appliquant un gradient de 0 à 0.5 M NaCl.

Une chromatofocalisation employant la colonne MonoP HR 5/20 (Pharmacia) équilibrée avec le tampon 25 mM Bis-Tris, 4% taurine (pour une meilleure solubilité des protéines) à pH 6.3 a permis une purification subséquente de la galactosidase. L'enzyme a été éluée par gradient de pH 6 à 4 grâce à un tampon composé de 10% (p/v) polybuffer 74 (Pharmacia) pH 4.0. Les fractions de 1 ml obtenues ont été tamponnées avec 100 μl d'une solution composée de 0.5 M KH_2PO_4 pH 7.0 dès leur élution.

Les fractions contenant la galactosidase ont été regroupées et dialysées contre un tampon contenant 50 mM KH_2PO_4 , 250 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 6.5. Le dialysat a été appliqué sur une colonne à interactions hydrophobes (Phényl-Superose HR 5/5 de Pharmacia) où deux gradients simultanés de 250 à 0 mM

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de 0 à 7% d'isopropanol ont permis l'élution de la galactosidase. Les fractions actives ont été regroupées et rapidement concentrées dans un sac à dialyse enrobé de PEG 20,000.

Une filtration sur gel (Superose 12 de Pharmacia) a été la dernière étape de purification. Le tampon employé était composé de 100 mM KH_2PO_4 et 50 mM KCl à pH 6.5. La galactosidase purifiée a été conservée dans 50% (v/v) glycérol à -20°C pendant au moins six mois sans perte d'activité.

Il a été également possible de purifier la galactosidase après six jours d'induction et en remplaçant l'étape de filtration sur gel de Sephacryl S-200 par une colonne semi-préparative Q-Sepharose "Fast Flow" (20 ml de gel dans une colonne XK16, Pharmacia) en utilisant les mêmes conditions que pour la colonne MonoQ.

2.3.2. Purification de la mannanase

L'activité de la mannanase a été retrouvée dans le surnageant à 50% de saturation en sulfate d'ammonium décrit ci-haut au point 2.3.1. Cette solution a été amenée à 95% de saturation en sulfate d'ammonium puis a été centrifugée à $45,000 \times g$ pendant 45 minutes à 4°C .

Le culot protéique a été dissout dans 20 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6.5) puis appliqué sur une colonne de chromatographie par filtration sur gel Sephacryl S-200 (26 mm x 90 cm, Pharmacia). Le tampon d'élution était composé de 100 mM KH_2PO_4 et 150 mM NaCl pH 6.5.

Les fractions actives recueillies ont été regroupées et ensuite soumises à une étape de purification sur échangeur de cations (colonne Mono S HR5/5 de Pharmacia). L'élution de l'enzyme a eu lieu grâce à un gradient de 0 à 0.3 M NaCl dans un tampon 20 mM MES pH 6.5.

La colonne de Phényl-Superose HR 5/5 a ensuite été utilisée dans les conditions suivantes: 1) tampon d'adsorption et de dialyse: 50 mM KH_2PO_4 , 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 6.5; 2) gradients simultanés: 500 à 0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 0 à 7% d'isopropanol. Trois fractions contenant une activité mannanase ont été par la suite séparément purifiées sur gel de filtration Superose 12 (Pharmacia) en suivant les conditions décrites au point 2.3.1.

Les trois mannanases (A, B et C) purifiées ont été conservées dans 50% (v/v) glycérol à -20°C pendant au moins six mois sans perte d'activité.

2.3.3. Purification de la xylanase

Une centrifugation de la culture de bactéries à 11,000 x g durant 20 minutes a permis de recueillir le surnageant où la xylanase sécrétée était contenue. Ce surnageant a été dialysé et appliqué sur une colonne échangeuse d'anions DEAE-Sephadex A-50. Le tampon de dialyse et de la colonne était composé de 40 mM histidine et 3 mM EDTA pH 5.7. L'élution a eu lieu en appliquant un gradient de 0 à 1 M NaCl. Cette première étape de purification est identique à celle décrite dans le mémoire d'Arezki Azzi (Azzi, 1991).

La seconde étape a fait intervenir une colonne semi-préparative à

interactions hydrophobes: la Phényl-Sepharose "Fast Flow" (XK20/16, Pharmacia). La colonne et l'échantillon ont été équilibrés dans un tampon 50 mM KH_2PO_4 , 600 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0. Les gradients simultanés d'élution de 600 à 0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de 0 à 7% d'isopropanol ont permis d'éluer l'enzyme.

Les fractions actives ont alors été dialysées et appliquées sur une matrice échangeur d'anions, la MonoQ HR 5/5, en utilisant le tampon 20 mM histidine pH 5.7. Le dialysat appliqué sur cet échangeur d'anions a été élué grâce à un gradient de 0 à 0.5 M NaCl.

L'étape suivante de purification a mis à profit les propriétés d'hydrophobicité des protéines mais en utilisant une colonne possédant un pouvoir de résolution plus élevée, la Phényl-Superose HR 5/5. Cette fois, le tampon utilisé était composé de 50 mM KH_2PO_4 , 400 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0. Les gradients simultanés d'élution allaient de 400 à 0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de 0 à 7% d'isopropanol.

L'éluat contenant l'activité xylanase a été concentré au PEG comme ci-haut décrit, puis a été appliqué sur une colonne Superose 12 équilibrée avec le tampon 100 mM KH_2PO_4 , 150 mM KCl à pH 6.5. La xylanase purifiée a été conservée dans 50% (v/v) glycérol à -20°C pendant quelques mois sans perte d'activité.

2.3.4. Purification de la xylosidase

L'activité extracellulaire xylosidase a été également retrouvée par centrifugation de la culture de bactéries à 11,000 x g durant 20 minutes.

Les trois premières étapes de purification sont les mêmes que celles décrites au point 2.3.3. Les fractions actives ont été dialysées contre le tampon 50 mM KH_2PO_4 , 600 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0 pour être ensuite appliquées sur une colonne de Phényl-Superose HR 5/5 prééquilibrée avec ce tampon. Les gradients simultanés d'élution étaient de 600 à 0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de 0 à 7% d'isopropanol.

Les fractions actives ont été regroupées et concentrées au PEG 20,000 (comme ci-haut décrit); puis elles ont été appliquées sur une colonne de Superose 12 équilibrée avec le tampon 100 mM KH_2PO_4 , 150 mM KCl à pH 6.5. La xylosidase purifiée a été conservée dans 50% (v/v) glycérol à -20°C pendant quelques mois sans perte d'activité.

2.4. Dosage de protéines

La quantité de protéines a été déterminée par le réactif BCA de la compagnie Pierce en utilisant la BSA comme standard. Certaines substances comme le sulfate d'ammonium interfèrent avec ce dosage (Brown et al., 1989). L'élimination de ces substances s'est faite par dialyse ou par précipitation avec du désoxycholate et du TCA.

2.5. Électrophorèse des gels de polyacrylamide

2.5.1. Gels SDS-polyacrylamide

La masse moléculaire des sous-unités des protéines a été déterminée par migration sur gel SDS-polyacrylamide en conditions réductrices par la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Le pourcentage d'acrylamide était de 12.5%. L'appareillage "Mini Protean II" de BioRad a été utilisé. La coloration au bleu de Coomassie R-250 a servi à révéler les bandes protéiques.

2.5.2. Gels natifs de polyacrylamide

Le nombre de sous-unités polypeptidiques des hémicellulases a été estimé par migration sur gel de polyacrylamide à gradient de 10-15% d'acrylamide dans des conditions non-dénaturantes et non-réductrices déjà préparé par Pharmacia. Le système d'électrophorèse qui a été utilisé est le "Phastsystem" de Pharmacia (Olsson et al., 1988). La coloration des protéines est également faite avec le bleu de Coomassie R-250.

2.6. Caractérisation des galactosidase et mannanase

2.6.1. pH optimal

Le pH optimal des enzymes purifiées a été déterminé en utilisant un tampon de McIlvaine composé de différentes proportions de citrate et de

phosphate pour obtenir une échelle de pH entre 3 et 9.

Une aliquote de 100 μ l (1.5 μ g) de mannanase a été incubée à 55°C pendant 10 minutes en présence de 200 μ l de tampon de McIlvaine et 200 μ l de LBG (0.5%, p/v), puis les sucres réducteurs produits ont été dosés par la méthode au DNSA (voir au point 2.2.2.).

Dans le cas de la galactosidase, l'essai d'un volume final de 1 ml était le suivant. L'enzyme (0.15 μ g) était ajoutée à 50 μ l de 20 mM PNPGal et 200 μ l de tampon de McIlvaine. Après 5 minutes d'incubation à 55°C, la réaction enzymatique était arrêtée et le produit dosé comme mentionné au point 2.2.1.

2.6.2. Spécificité

La spécificité de la galactosidase purifiée a été déterminée en dosant les sucres réducteurs produits par la méthode au DNSA (point 2.2.2.) lorsque les substrats étaient la gomme guar, la gomme de caroube, le melibiose, le stachyose et le raffinose. L'enzyme (75ng) a été incubée avec 50 μ l de tampon KH_2PO_4 200 mM pH 7.0 et 100 μ l de gomme guar ou gomme de caroube (0.5%, p/v), 1 μ mol de melibiose, 1 mg de stachyose ou 1 mg de raffinose comme substrat. L'échantillon d'un volume final de 500 μ l a été incubé durant 20 heures à 60°C.

L'activité enzymatique envers le PNPGal a été déterminée de la même façon que le dosage normal (voir point 2.2.1.) mais la réaction a été incubée pendant 20 heures.

La méthode au DNSA (Bernfeld, 1955) a été utilisée pour déterminer l'activité mannanase envers la gomme guar, la LBG, la mannane de *Saccharomyces cerevisiae*, la xylane d'avoine, le sigmacell, l'avicel et la carboxyméthyl cellulose. L'enzyme (1.5 µg) a été incubée avec 200 µl d'une suspension d'un de ces substrats (0.5%, p/v) et 50µl de 500 mM KH_2PO_4 pH 6.5 durant 20 heures (5 minutes pour la gomme guar et la LBG) à 70°C.

2.6.3. Cinétique

Les essais en vue de déterminer la vitesse maximale (V_m) et la constante de Michaelis (K_m) ont été faits dans les mêmes conditions qu'aux points 2.2.1. et 2.2.2. traitant des dosages d'activité galactosidase et mannanase. Cependant les températures d'incubation étaient de 60°C et 70°C pour la galactosidase (75 ng) et la mannanase (0.75µg) respectivement.

2.6.4. Thermostabilité

La thermostabilité a été déterminée en incubant l'enzyme sans substrat pour des temps divers.

La galactosidase (0.15 µg) a été incubée dans un tampon 20 mM KH_2PO_4 pH 7.0 à une température donnée pendant une période de temps pouvant aller jusqu'à 24 heures. La mannanase (1.5 µg) a été incubée dans un tampon 50 mM KH_2PO_4 pH 6.5 à une température donnée pendant une période de temps pouvant aller jusqu'à 24 heures.

L'activité a ensuite été mesurée pour les deux hémicellulases selon les méthodes utilisées normalement qui sont décrites aux points 2.2.1. et 2.2.2.

2.6.5. Mode d'action de la mannanase

Le degré de polymérisation des oligosaccharides produits par digestion enzymatique par la mannanase a été déterminé par filtration sur gel. Une digestion extensive de la LBG a été faite de la façon suivante: 3 µg de mannanase et 1 mg de substrat ont été incubés durant 48 heures à 55°C. Après l'incubation, l'essai a été centrifugé à 12,000 x g pendant 5 minutes.

Le surnageant incubé 2 minutes dans l'eau bouillante a été appliqué sur une colonne de filtration sur gel. La matrice qui a été utilisée est une colonne de Bio-Gel P-4 (<400 mesh, Bio-Rad Laboratories) de 90 cm de hauteur et 16 mm de diamètre. L'éluant était de l'eau à 55°C (Sabbagh et Fagerson, 1973). Les oligosaccharides ont été détectés par changement d'indice de réfraction grâce à un moniteur "Beckman Refractive Index Detector" (modèle 156) couplé à un intégrateur de la compagnie Hewlett-Packard (modèle 3392A).

2.6.6. Point isoélectrique (pI)

Le pI de la galactosidase et de la mannanase a été déterminé par focalisation isoélectrique en utilisant un appareil "Mini IEF Cell" (modèle 111, Bio-Rad). La matrice de migration était composée de polyacrylamide 5% et d'ampholytes de pH 3 à 10 (Biolyte 3/10, Bio-Rad). Les instructions de la

compagnie BioRad ont été respectées.

2.7. Construction des bibliothèques d'ADN génomique

Toutes les techniques courantes de manipulation de l'ADN qui ont été utilisées proviennent de deux ouvrages de référence: "Molecular cloning, a laboratory manual" (Sambrook et al., 1989) et "Current protocols in molecular biology" (Ausubel et al., 1987).

2.7.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique de *B. stearothermophilus* NCA 2184 a été isolé d'après la technique de Yang et coll. (Yang et al., 1988). Mais l'étape de digestion à la lysozyme et à la RNase n'a duré que 2 heures.

2.7.2. Digestions partielles et purification par gradient de sucrose

Deux sites de clonage ont été pris en considération afin de constituer des bibliothèques de gènes de *B. stearothermophilus*, soient les sites *EcoRI* et *HindIII*.

L'ADN génomique extrait (200 µg, point 2.7.1.) a été partiellement digéré par l'une ou l'autre des enzymes de restriction (*EcoRI* ou *HindIII*) de façon optimale (3U de *EcoRI* ou *HindIII* par µg d'ADN, 1 heure à 37°C) pour obtenir le plus de fragments de 2 à 10 kb de longueur.

Ces digestions ont été extraites au phénol:chloroforme puis précipitées à

l'isopropanol afin de déposer cet ADN solubilisé (avec tampon 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.6) sur un gradient préformé de sucrose 10 à 40%. Les tubes ont été centrifugés à 4°C durant 20 heures dans un rotor SW-40 à 25,000 rpm.

Après centrifugation, des fractions de 750 µl ont été recueillies par le haut du tube avec une pipette Pipetman P-1000 (Gilford) avec précaution. Les fractions ont été analysées sur gel d'agarose 0,7% et celles ayant de l'ADN de 2 à 10 kb de longueur ont été regroupées, précipitées à l'isopropanol puis resuspendues dans un tampon Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 7.6.

2.7.3. Ligation et transformation

Les fragments d'ADN génomique obtenus au point précédent ont été ligués au vecteur pUC18 (Pharmacia) préalablement digéré par l'enzyme *EcoRI* ou *HindIII* et déphosphorylé par la phosphatase alcaline de muqueuse intestinale de veau (Boehringer Mannheim). La ligation a été faite avec la T4 DNA ligase (Pharmacia) où le ratio vecteur:insert était de 1:1 et 1:3 pour les sites *EcoRI* et *HindIII* respectivement.

La souche de *E. coli* DH5αMCR (Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc.) hypercompétente a été utilisée pour la transformer par les produits de ligation ci-haut mentionnés. Le protocole de transformation du fabricant a été respecté, utilisant 2 à 40 ng d'ADN pour 100 µl de bactéries hypercompétentes.

2.7.4. Amplification et conservation des bibliothèques d'ADN génomique

Les bactéries transformées ont été étalées sur des boîtes de pétris contenant le milieu de culture "DYT" (Sambrook et al., 1989) complémenté avec de l'ampicilline à 60µg/ml. Ces boîtes, de 25cm x 25cm, contenaient au plus 5000 colonies. Après incubation à 37°C durant une nuit, les colonies ont été doucement resuspendues avec du milieu de culture liquide "DYT"-ampicilline à l'aide d'une tige à bout caoutchouté stérile. La suspension de bactéries a été doucement agitée afin d'homogénéiser puis conservées à -70°C en aliquotes de 1 ml dans 15% glycérol.

2.8. Criblage des bibliothèques d'ADN génomique

Le criblage des bibliothèques d'ADN a été fait en sélectionnant les colonies ayant l'activité de l'hémicellulase désirée. Pour ce faire, les bactéries ont été étalées et incubées pendant une nuit à 37°C sur des boîtes de pétris (25cm x 25cm) contenant le milieu de culture "DYT" et de l'ampicilline (60 µg/ml). Par la suite, une réplique a été faite avec une membrane de nylon Hybond d'Amersham et cette réplique a été étalée sur des pétris indicateurs (points 2.8.1. à 2.8.4) selon l'activité recherchée. Les techniques de criblage des activités mannanase et xylanase sont des variations des protocoles décrits par Kluepfel (1988).

2.8.1. Criblage de l'activité galactosidase

La membrane de nylon contenant les colonies de la bibliothèque a été incubée durant une heure à 60°C dans un pétri vide, les bactéries vers le haut, afin d'inactiver les galactosidases de la bactérie hôte. Ensuite la membrane a été appliquée sur un pétri contenant: agarose 1% (p/v), 20 mM KH_2PO_4 pH 7.0, 20 mM EDTA et 1mM PNPGal. Ce pétri a ensuite été incubé à 60°C quelques minutes jusqu'à l'apparition d'un halo jaune autour des colonies positives. Ce protocole est une adaptation de celui rapporté par Paoni et Arroyo (1984).

2.8.2. Criblage de l'activité mannanase

2.8.2.1. Préparation du substrat coloré

Le substrat utilisé pour le criblage de la bibliothèque est la gomme de caroube (LBG) couplée au bleu de rémazol brillant ("Remazol Brilliant Blue" ou RBB). Le protocole de préparation de ce substrat coloré (RBB-LBG) est celui rapporté par McCleary (McCleary, 1988a).

2.8.2.2. Révélation des colonies positives

La membrane de nylon contenant les colonies de la bibliothèque a été appliquée sur un pétri contenant le milieu minimal M9 (Sambrook et al., 1989) avec du mannitol 0.2% au lieu du glucose, du RBB-LBG 0.5% et de l'ampicilline à une concentration finale de 60 µg/ml. Le pétri a ensuite été incubé à 37°C

pendant la nuit et ensuite à 55°C durant 24 heures.

2.8.3. Criblage de l'activité xylanase

La membrane de nylon contenant les colonies de la bibliothèque d'ADN génomique a servi de réplique pour un pétri contenant le milieu minimal M9 (Sambrook et al., 1989) avec du mannitol 0.2% au lieu du glucose, du RBB-xylane (Sigma) 0.1% et de l'ampicilline à une concentration finale de 60 µg/ml. Le pétri a ensuite été incubé à 37°C pour la nuit et à 55°C pendant 24 heures.

2.8.4. Criblage de l'activité xylosidase

La membrane de nylon contenant les colonies de la bibliothèque a été incubée durant une heure à 60°C dans une boîte de pétri vide, les bactéries vers le haut. Ensuite la membrane a été déposée sur une boîte de pétri contenant: agarose 1% (p/v), 50 mM d'acétate de sodium pH 5.5, 20 mM EDTA et 1mM PNPXyl. Ce pétri a ensuite été incubé à 60°C jusqu'à l'apparition d'un halo jaune autour des colonies positives, soit pendant quelques minutes.

2.9. Caractérisation des clones

2.9.1. Préparation de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique des clones positifs a été extrait par lyse alcaline des bactéries (Sambrook et al., 1989). L'ADN plasmidique ainsi extrait a été digéré par l'enzyme de restriction appropriée (*EcoRI* ou *HindIII*) puis analysé en électrophorèse sur gel d'agarose 0.7%.

2.9.2. Localisation de l'activité des hémicellulases

Les fractions extracellulaire, périsplasmique et intracellulaire ont été séparées d'après le protocole développé par Nilsson (Nilsson et al., 1991). L'activité des hémicellulases a été dosée selon les protocoles décrits au point 2.2.

2.9.3. Zymogrammes des hémicellulases recombinantes

2.9.3.1. Zymogramme des galactosidases

Un gel natif (conditions non dénaturantes et non réductrices) de 5 à 15% de polyacrylamide discontinu de pH 7.8 et 8.3 avec le tampon Tris-glycine a été préparé. Les protéines des fractions périsplasmique et intracellulaire ont été séparées sur ce gel, ainsi que la galactosidase purifiée (comme au point 2.3.1). Une fois l'électrophorèse terminée, le gel a été mis en contact avec une membrane de nylon trempée dans une solution contenant 1 mM PNPGal, 20 mM

EDTA et 20 mM KH_2PO_4 pH 7.0. Le tout a été incubé à 60°C pendant quelques minutes.

2.9.3.2. Zymogramme des mannanases

Un gel SDS-polyacrylamide de 12.5% contenant 0.5% RBB-LBG a servi à révéler la taille des protéines recombinantes possédant une activité mannanase. Après la migration électrophorétique, le gel a été trempé 2 fois pendant 30 minutes dans une solution constituée de 50 mM KH_2PO_4 pH 6.5 et 25% (v/v) isopropanol. Le gel a ensuite été plongé dans le tampon 50 mM KH_2PO_4 pH 6.5 durant 15 minutes, 2 fois également. Il a ensuite été incubé à 60°C pendant toute la nuit dans le tampon 50 mM KH_2PO_4 pH 6.5. Des zones d'éclaircissement ont été rendues visibles en trempant dans une solution éthanol : citrate de sodium 0.2 M pH 4.8 (2:1) (Royer et Nakas, 1990).

2.9.3.3. Zymogramme des xylanases

Un gel de 5 à 15% de polyacrylamide (conditions non dénaturantes et non réductrices, V. section 2.9.3.1) a été utilisé afin de vérifier la taille des xylanases recombinantes produites dans les fractions périplasmique et intracellulaire. A ce gel a été incorporé le substrat, soit la xylane d'avoine à 0.5% (p/v) de concentration finale. Le gel a ensuite été incubé durant 3 heures à 60°C puis mis dans de l'éthanol 95% jusqu'à ce que le gel soit complètement opaque. Le gel est ensuite trempé pendant 3 jours dans la solution éthanol : citrate de sodium

0.2 M pH 4.8 (2:1) afin de mieux visualiser les zones claires (Royer et Nakas, 1990).

2.9.3.4. Zymogramme des xylosidases

Les xylosidases recombinantes ont été révélées sur gel SDS-polyacrylamide 12.5% (Laemmli, 1970). Après l'électrophorèse, l'activité des xylosidases a été révélée en déposant une membrane de nylon saturée d'un tampon et du substrat (20 mM KH_2PO_4 pH 6.0 et 2 mM PNPXyl) sur le gel rincé à l'eau pour enlever l'excédant de tampon d'électrophorèse. Une incubation de quelques minutes a permis de révéler des bandes jaunes. Pour intensifier la coloration, un trempage rapide (quelques secondes) dans 0.3M Na_2CO_3 a été requis (Paoni et Arroyo, 1984).

2.10. Séquençage de la partie N-terminale des hémicellulases

2.10.1. Transfert des protéines sur membrane PVDF

Les protéines à séquencer ont été séparées sur gel SDS-PAGE 12.5% en polyacrylamide puis transférées sur membrane de "polyvinylidene difluoride" (PVDF) selon le protocole de la compagnie BioRad. L'appareillage employé est le "Mini-Protean II" de BioRad.

Le tampon d'électrophorèse du compartiment du haut, cependant, contenait 0.1 mM thioglycolate en plus et les échantillons protéiques (dont la

quantité est de 10 à 100 pmol) n'étaient pas préincubés durant 2 minutes dans l'eau bouillante mais incubés plutôt pendant 10 minutes à 37°C. Le transfert sur membrane PVDF a été fait à un ampérage constant de 150 mA pour une heure en présence de 0.1% (p/v) de SDS dans le tampon de transfert (14.4 g glycine, 3 g Tris base et 20 % méthanol).

2.10.2. Séquençage de la partie N-terminale

Les bandes protéiques transférées sur membrane PVDF ont ensuite été découpées et les séquences N-terminales de galactosidase, xylanase et mannanase B et C ont été déterminées par le Dr Claude Lazure de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal.

2.10.3. Séquençage de l'ADN plasmidique

L'identité des clones mannanase et galactosidase a été vérifiée en séquençant sommairement l'ADN plasmidique des clones positifs avec pour amorce, un oligonucléotide dont la séquence a été déduite à partir de la séquence N-terminale obtenue (de la façon décrite au point 2.10.2.). Le séquençage a été fait à température élevée (70°C) avec l'ensemble "AmpliTaq Cycle Sequencing Kit" et un appareil thermocycleur (modèle 480), tous deux de la compagnie Perkin Elmer Cetus. Le moyen de détection utilisé est le marquage à l'extrémité 5' de l'amorce au ^{32}P par phosphorylation par la T4 polynucléotide kinase (Pharmacia). Les directives de la compagnie ont été respectées.

2.11. Sous-clonage et séquençage du gène de la chitosanase de *B. megaterium*

Afin de séquencer plus facilement le gène de la chitosanase de *B. megaterium* déjà cloné par le Dr Anne Pelletier (1991), celui-ci a été sous-cloné à partir du plasmide pBR322 dans les phages M13mp8 et M13mp19 aux sites de restriction *Hind*III-*Acc*I de la façon suivante.

Le clone dénommé pBR172 (2 µg) a été digéré par les enzymes de restriction *Hind*III et *Acc*I afin de libérer l'insert. Aussi, 200 ng des vecteurs M13mp8 et M13mp19 ont été ainsi digérés afin de procéder à une ligation. Un gel d'agarose à faible point de fusion a servi à récupérer les inserts. Les bandes découpées de ce gel ont été diluées à 0.1% d'agarose (avec du tampon 10 mM Tris pH 8.0) puis une portion (500 ng) a été liguée avec les vecteurs M13mp (50 ng) par la T4 DNA ligase. Les ligations ont ensuite servi à transformer les bactéries *E. coli* XL-1 Bleues rendues compétentes par la technique au chlorure de calcium (Sambrook et al., 1989).

La transformation a été faite de la façon suivante. Des quantités d'ADN ligué de 2, 10 et 50 ng ont été mises en présence de 300 µl de cellules compétentes (*E. coli* XL-1 Bleues). Elles ont été incubées pendant 40 minutes sur la glace. Un choc de température de 45 secondes à 42°C puis 5 minutes sur glace a par la suite été effectué. Un mélange constitué de 3 ml de bactéries en phase logarithmique, de 600 µl d'IPTG 100 mM et de 600 µl de X-gal 2% a été ajouté. Trois ml de milieu semi-solide agar H de surface ("H top agar") à une température de 48°C a été ajouté. Ce mélange a été rapidement versé dans

une boîte de pétri contenant un milieu agar H, puis a été incubé à 37°C pendant une période de 8 à 12 heures (afin de développer des zones où la croissance des cellules en phase logarithmique est ralentie par la présence du bactériophage M13).

Des plages non colorées en bleu ont servi à inoculer 2 ml de DYT contenant de la tétracycline (12 µg/ml) et 20 µl de cellules XL1 Bleues. Les bactéries ont été incubées sous agitation à 37°C pendant 5 heures. Ces cultures ont été centrifugées afin d'obtenir un culot contenant les bactéries infectées par M13 sous sa forme répliquative d'ADN à brin double (ADN RF). Les surnageants contenaient le bactériophage M13 sous sa forme filamenteuse (ADN à brin simple). Le clone a été analysé en faisant des extractions de l'ADN RF par le protocole habituel de lyse alcaline suivies d'une électrophorèse sur gel d'agarose des digestions de l'ADN extrait avec les enzymes de restriction *HindIII* et *AccI*.

Les surnageants (1 ml) des clones positifs ont servi à infecter 100 ml de bactéries *E. coli* XL1 bleues en phase logarithmique. L'infection a été faite pendant 4 heures à 37°C avec agitation. Une centrifugation à 5,000 x g durant 30 minutes à 4°C a permis de recueillir le surnageant. Du PEG 8,000 20% dans 2.5 M NaCl (0.2 volumes) a été ajouté, puis ce mélange a été incubé durant 1 heure à 4°C. L'ADN précipité a été recueilli grâce à une centrifugation à 5,000 x g à 4°C pendant 20 minutes. Le culot a été recentrifugé dans les mêmes conditions mais pendant 5 minutes puis a été solubilisé dans 500 µl de tampon 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.6 et recentrifugé pendant 5 minutes (afin

d'éliminer les bactéries restantes possibles). Une solution de PEG 8,000 20% et 2.5 M NaCl (200 µl) a été ajoutée, suivi d'une incubation de 15 minutes à la température ambiante ou toute la nuit à 4°C. L'ADN précipité a été centrifugé pendant 5 minutes (12,000 x g à 4°C) et le surnageant a été enlevé. Ce culot a été centrifugé une autre fois quelques minutes afin d'éliminer toute trace de PEG 8,000. Le culot a ensuite été solubilisé dans 500 µl de tampon 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.6. Un volume de 200 µl de phénol saturé par ce tampon a été ajouté. Les deux phases organique et aqueuse ont été vigoureusement agitées et laissées pendant 15 minutes à température ambiante. Les phages ainsi débarassés de leur capsid ont ensuite été soumis à une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) (Sambrook et al., 1989).

Le séquençage subséquent à partir d'ADN à brin simple a été fait lors d'un stage à l'université Boston University dans le laboratoire du Dr Dean Tolan du département de biologie. Le protocole utilisé était celui de la trousse de séquençage de la compagnie United States Biochemical. Le radioisotope qui a été utilisé est le ^{35}S (incorporation d' α -[^{32}P] dATP).

2.12. Criblage de la bibliothèque d'ADN génomique de *Bacillus megaterium* par la technique de PCR

2.12.1. Reconstruction de la bibliothèque d'ADN génomique

Une bibliothèque d'ADN génomique de *B. megaterium* spP1 a été réamplifiée en transformant des cellules DH5 α MCR hypercompétentes avec l'ADN génomique digéré par l'enzyme *Sau*3A puis purifié par gradient de sucrose et ligué au vecteur pBR322 préparé par Anne Pelletier (1991). Les cellules transformées ont été étalées, amplifiées et conservées comme décrit au point 2.7.4.

2.12.2. Criblage par la technique de PCR

La région 5' du gène de la chitosanase a été recherchée au niveau de l'ADN génomique par la technique de PCR. Les deux oligonucléotides (35-14-6 et 474-495-6) utilisés comme amorces permettent d'amplifier une région de 530 paires de bases qui recouvre la séquence codant le peptide signal (en 5' de la séquence codant la protéine mature) et les 330 nucléotides suivants (codant pour 110 acides aminés de la protéine mature). L'appareil de PCR utilisé est le modèle 480 de la compagnie Perkin-Elmer Cetus. Le programme utilisé est le suivant: 1) 2 minutes à 95°C, 2) 1 min à 95°C, 3) 1 min à 55°C, 4) 2 min à 72°C, 5) répéter les étapes 2) à 4) 40 fois, 6) 5 min à 72°C et 7) conserver à 4°C.

3. RÉSULTATS

3.1. Courbe de production des hémicellulases

3.1.1. Sélection sur milieu solide

Avant de procéder à l'induction en milieu liquide, une présélection de colonies de *B. stearothermophilus* a été faite en étalant sur milieu solide minimal ayant de la LBG ou du xylane d'avoine (1%, p/v) comme source de carbone. De cette façon, l'induction est optimale. Il n'y a pas de halo d'éclaircissement visible autour des colonies. Un halo d'éclaircissement est observé lorsque des bactéries, étalées sur milieu de culture solide contenant le substrat insoluble (donc ayant une opacité), sécrètent des hémicellulases. Les produits d'une hydrolyse enzymatique, les oligosaccharides, vont alors diffuser et une zone claire entourant les colonies sera visible.

3.1.2. Induction en milieu liquide minimal

La production extracellulaire des hémicellulases étudiées se faisant lorsque les bactéries sont en phase stationnaire, le protocole décrit au point 2.1.2. a été utilisé afin d'induire en présence d'une bonne densité de cellules. L'induction des protéines qui en découle est illustrée à la figure 1. L'activité de la galactosidase est à son maximum après 5 jours d'induction. La présence d'une enzyme intracellulaire, l'aldolase, a été mesurée dans le milieu de culture au même

moment que le dosage de l'activité galactosidase. Son profil de production indique que des cellules sont lysées et semble plafonner après 3 jours. Pour des raisons pratiques, la galactosidase a été récupérée au même moment que celui où l'activité de la mannanase est maximale, soit à 2 jours d'induction.

La mannanase est sécrétée à un niveau de 0.9 U/ml et la galactosidase présente dans le milieu extracellulaire est de l'ordre de 0.02 U/ml. Le taux maximal de galactosidase, après 5 jours d'induction, est de 0.07U/ml. Les profils d'induction des xylanase et xylosidase ont été réalisés dans notre laboratoire par Arezki Azzi (1991).

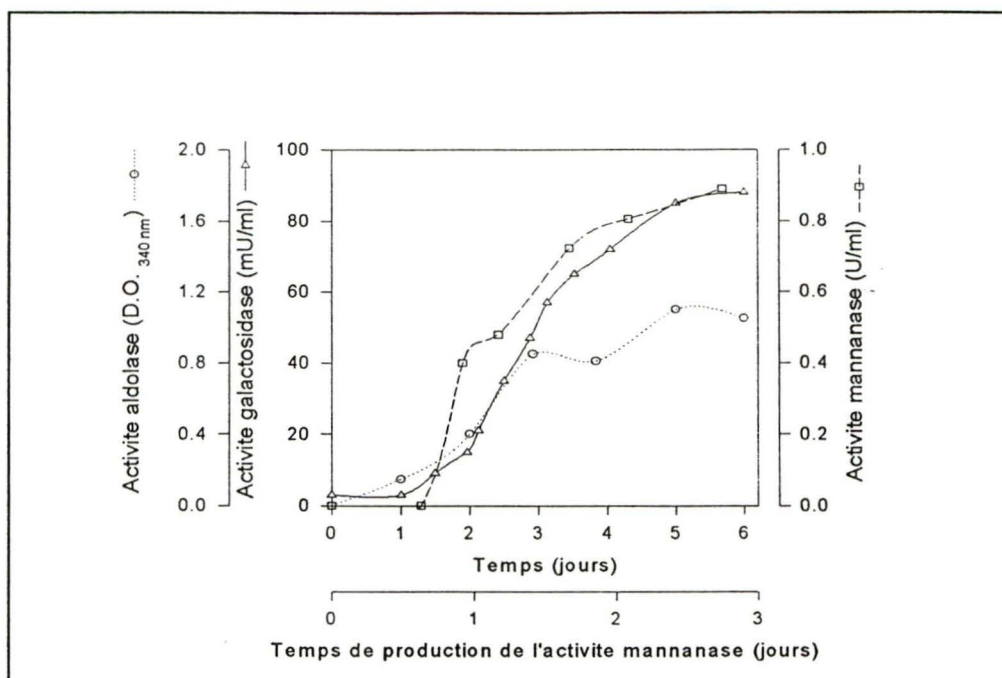


Figure 1 : Profil de production des activités galactosidase et mannanase. Les activités des galactosidase (Δ), mannanase (\square) et aldolase (\circ) retrouvées dans le milieu extracellulaire ont été dosées comme décrit dans la section matériels et méthodes.

3.2. Purification des hémicellulases

Les quatres hémicellulases -soient les galactosidase, mannanase, xylanase et xylosidase- qui sont retrouvées dans le milieu extracellulaire ont été purifiées jusqu'à homogénéité par fractionnement au sulfate d'ammonium puis par divers types de chromatographie. Le système F.P.L.C. ("Fast Protein Liquid Chromatography" de Pharmacia-LKB) a été utilisé.

3.2.1. Purification de la galactosidase

La purification de la galactosidase est résumée au tableau I. Les valeurs indiquées représentent une purification typique. L'étape la plus importante est celle utilisant la colonne à interactions hydrophobes (la Phényl-Superose) où l'activité spécifique passe de 4.4 U/mg à 130 U/mg. Le facteur de purification final est de 4,275 fois, avec un rendement de 12%. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée est de 160 U/mg et pouvait varier de 140 à 170 U/mg selon la préparation obtenue après les deux jours de production en phase sur-stationnaire. La figure 2 représente les profils typiques d'élution (chromatogrammes) de la galactosidase sur les différentes matrices chromatographiques utilisées.

TABLEAU I. Purification de la galactosidase

Étape de purification	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	52	1,380	0.04	---	---
Sulfate d'ammonium (20-50%)	51.7	162	0.32	98	8.5
Séphacryl S-200	47	135	0.35	90	9.4
Mono Q	47	25	1.9	90	51
Mono P	30	7	4.4	58	117
Phényl-Superose	10.6	0.08	130	20	3,470
Superose 12	5.9	0.04	160	12	4,275

L'activité a été dosée tel que décrit au point 2.2. Les protéines ont été dosées tel que décrit au point 2.4.

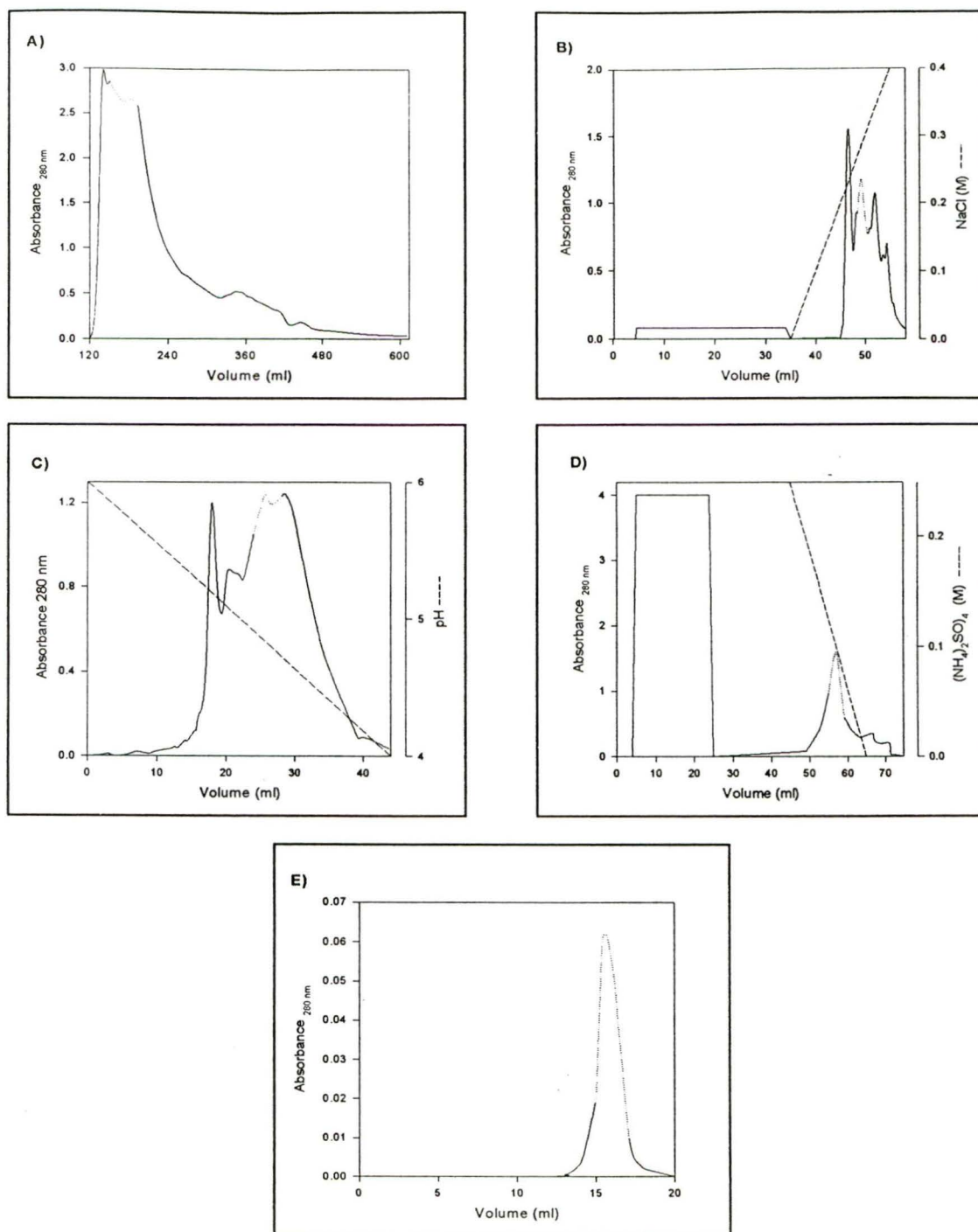


Figure 2 : Chromatogrammes de la purification de la galactosidase après 2 jours d'induction. A) Séphacryl S-200; B) MonoQ; C) MonoP; D) Phényl-Superose; E) Superose12. La région de la courbe d'absorbance à 280 nm qui est tracée en pointillé indique où l'activité de la galactosidase a été détectée.

La galactosidase a également été purifiée jusqu'à homogénéité en induisant la production de l'enzyme durant six jours au lieu de deux jours, et en utilisant une colonne préparative, la Q-Sépharose FF, au lieu de la Séphacryl S-200. Cette dernière modification diminue le temps de purification (quatre jours au lieu de cinq), et le rendement final est légèrement supérieur à celui obtenu avec la colonne Séphacryl S-200 (20 % au lieu de 12%). De plus, le fait de laisser l'induction se poursuivre pendant quatre journées de plus permet d'obtenir environ quatre fois plus de protéines purifiées ayant une activité spécifique de 147 U/mg. C'est encore la colonne de Phényl-Superose qui permet de purifier le plus bien que la chromatofocalisation avec la matrice Mono P soit aussi importante. La figure 3 montre les chromatogrammes de cette purification.

TABLEAU II. Purification de la galactosidase après 6 jours d'induction

Étape de purification	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	120	922	0.13	---	---
Sulfate d'ammonium (20-50%)	150	285	0.53	100	4
Q-Sépharose FF	94	173	0.54	78	4.1
Phényl-Superose	54	4.3	12.6	45	95
Mono P	54	0.4	138	45	1050
Superose 12	24	0.16	150	20	1110

L'activité a été dosée tel que décrit au point 2.2. Les protéines ont été dosées tel que décrit au point 2.4.

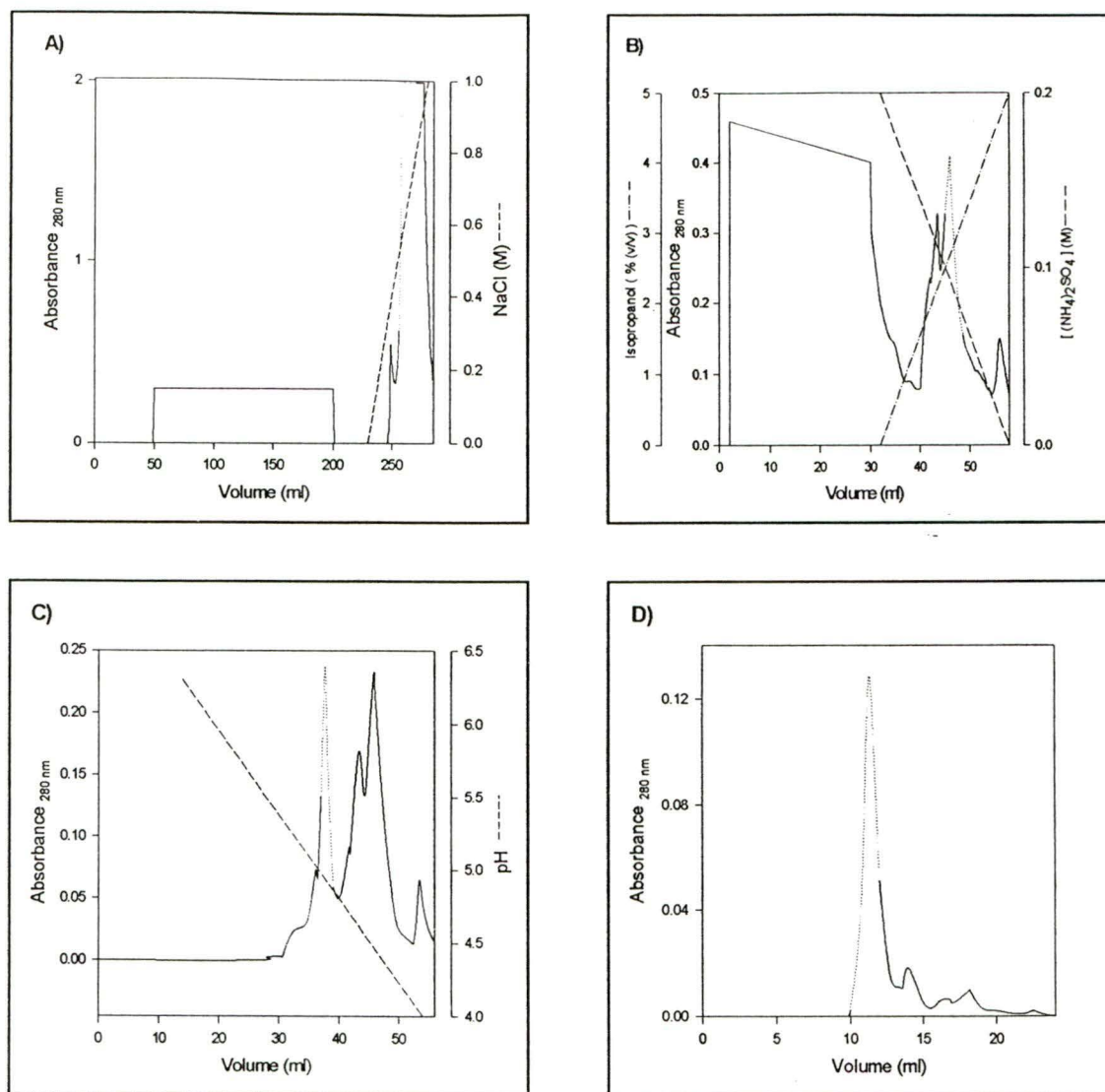


Figure 3 : Chromatogrammes de la purification de la galactosidase après 6 jours d'induction. A) Q-Sepharose Fast Flow; B) Phényl-Superose; C) Mono P et D) Superose 12. La région de la courbe d'absorbance à 280 nm qui est tracée en pointillé indique où l'activité de la galactosidase a été détectée.

3.2.2. Purification de la mannanase

La purification de la mannanase est résumée au tableau III. L'étape de purification par colonne à interactions hydrophobes (Phényl-Superose) a permis de séparer 3 pics d'activité (voir la figure 4C) qui correspondent aux mannanases A, B et C du tableau III. L'activité spécifique des mannanases B et C est pratiquement la même (100 U/mg pour la mannanase B et 97 U/mg pour la mannanase C). L'activité spécifique de la mannanase A est de 80 U/mg. L'activité spécifique pouvait varier de 75 à 115 U/mg pour les mannanase B et C; et elle pouvait varier de 50 à 100 U/mg pour la mannanase A. La mannanase B représente 75 % de l'activité totale finale et les mannanases A et C représentent respectivement 5 % et 20 % de l'activité totale finale. Seule la mannanase B a été caractérisée (point 3.3).

Les chromatogrammes de la purification des mannanases sont représentés à la figure 4. On peut noter que les trois pics obtenus de l'élution de la Phényl-Superose sont bien distincts.

TABLEAU III. Purification de la mannanase

Étape de purification	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	2,890	1,230	2.3	---	---
Sulfate d'ammonium (50-95%)	1,620	380	4.3	56	1.9
Séphacryl S-200	1,055	135	7.8	36	3.4
Mono S	475	11	43	16	19
Phényl-Superose					
A	55	1	55.5	1.9	24
B	160	2.6	61.5	5.5	27
C	50	0.9	56.8	1.7	25
Superose 12					
A	10.6	0.13	80	0.37	35
B	130	1.3	100	4.5	43
C	36	0.37	97	1.2	42

L'activité a été dosée tel que décrit au point 2.2. Les protéines ont été dosées tel que décrit au point 2.4.

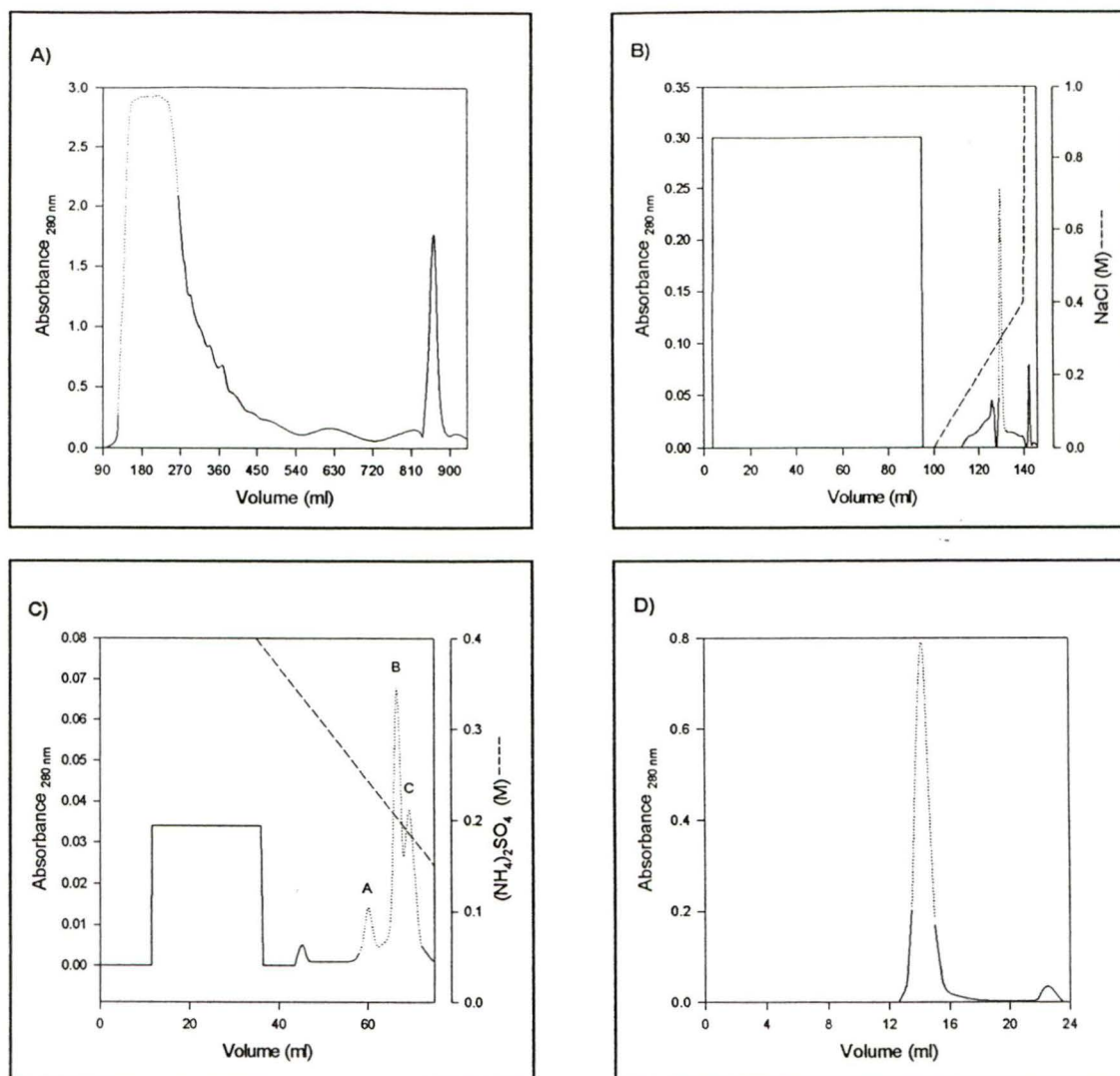


Figure 4 : Chromatogrammes de la purification de la mannanase. A) Séphacryl S-200; B) MonoS; C) Phényl-Superose et D) Superose12. La région de la courbe d'absorbance à 280 nm qui est tracée en pointillé indique où l'activité de la mannanase a été détectée.

Les mannanases ont aussi été purifiées avec une colonne préparative, la S-Sepharose FF, au lieu de la colonne Séphacryl S-200. Malgré un temps de purification diminué, le rendement obtenu est inférieur à la purification de départ: 1.2% au lieu de 4.5%. Cependant, les activités spécifiques sont semblables et les mannanases B et C sont homogènes.

Les chromatogrammes de la figure 5 montrent que l'activité mannanase est encore divisée en trois (A, B et C) en éluant sur la matrice à interactions hydrophobes. Les trois activités ont été éluées séparément en filtration sur gel (Superose12). Le volume d'élution pour les mannanases B et C est le même (figures 5D et 5E), soit 14.8 ml. Par contre, la mannanase A est éluee plus tardivement (à 18.5 ml; figure 5F) suggérant qu'elle forme un plus petit complexe avec une protéine contaminante pouvant être normalement associée avec elle. Il est aussi probable que la mannanase A ait plus d'interactions avec la matrice pouvant ainsi la retarder dans le gel. Une électrophorèse en conditions dénaturantes et réductrices des mannanases purifiées (figure 8) montre que la mannanase A contient une bande supplémentaire de masse moléculaire différente (voir la section 3.3.1).

TABLEAU IV. Purification de la mannanase avec colonne préparative

Étape de purification	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	3,390	1,640	2.1	---	---
Sulfate d'ammonium (50-95%)	1,820	510	3.6	55	1.7
S-Sepharose Fast Flow	340	33	10.2	10	4.9
Mono S	180	6.4	28	5	13
Phényl-Superose					
A	24	.4	62	0.6	30
B	60	1	60	2	30
C	19	.3	56	0.6	27
Superose 12					
A	4	.08	50	0.1	24
B	50	.5	98	1.2	47
C	13	.1	120	0.4	57

L'activité a été dosée selon les conditions décrites au point 2.2. Les protéines ont été dosées tel que décrit au point 2.4.

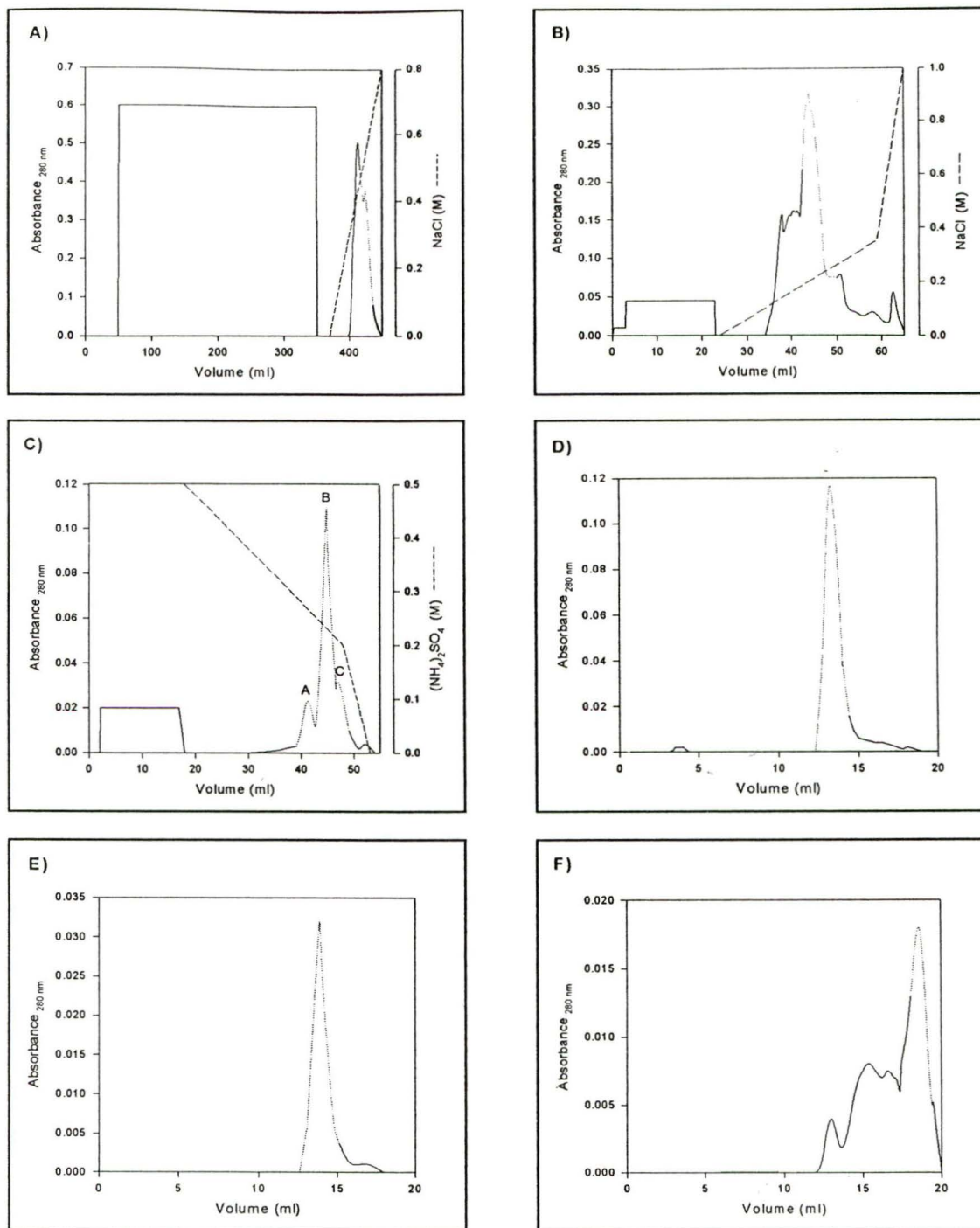


Figure 5 : Chromatogrammes de la purification de la mannanase avec colonne préparative. A) S-sepharose "Fast Flow"; B) Mono S; C) Phényl-Superose; Superose12 de D) mannanase B; E) mannanase C et F) mannanase A. La région de la courbe d'absorbance à 280 nm qui est tracée en pointillé indique où l'activité de la mannanase a été détectée.

3.2.3. Purification de la xylanase

Le tableau V résume la purification de la xylanase. Malgré un rendement de 1.6%, la xylanase obtenue a été purifiée 227 fois et a une activité spécifique de 250 U/mg.

La figure 6 montre l'élution de la xylanase dans les diverses chromatographies.

TABLEAU V. Purification de la xylanase

Étape de purification	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	355	325	1.1	—	—
DEAE-Sephadex A-50	190	87	2.2	54	2
Phényl-Sepharose FF	160	21	7.5	45	6.8
Mono Q HR 5/5	23	0.9	26.5	6.4	24
Phényl-Superose HR 5/5	6	0.1	60	1.7	55
Superose 12	5.6	0.02	250	1.6	227

L'activité a été dosée tel que décrit au point 2.2. Les protéines ont été dosées tel que décrit au point 2.4.

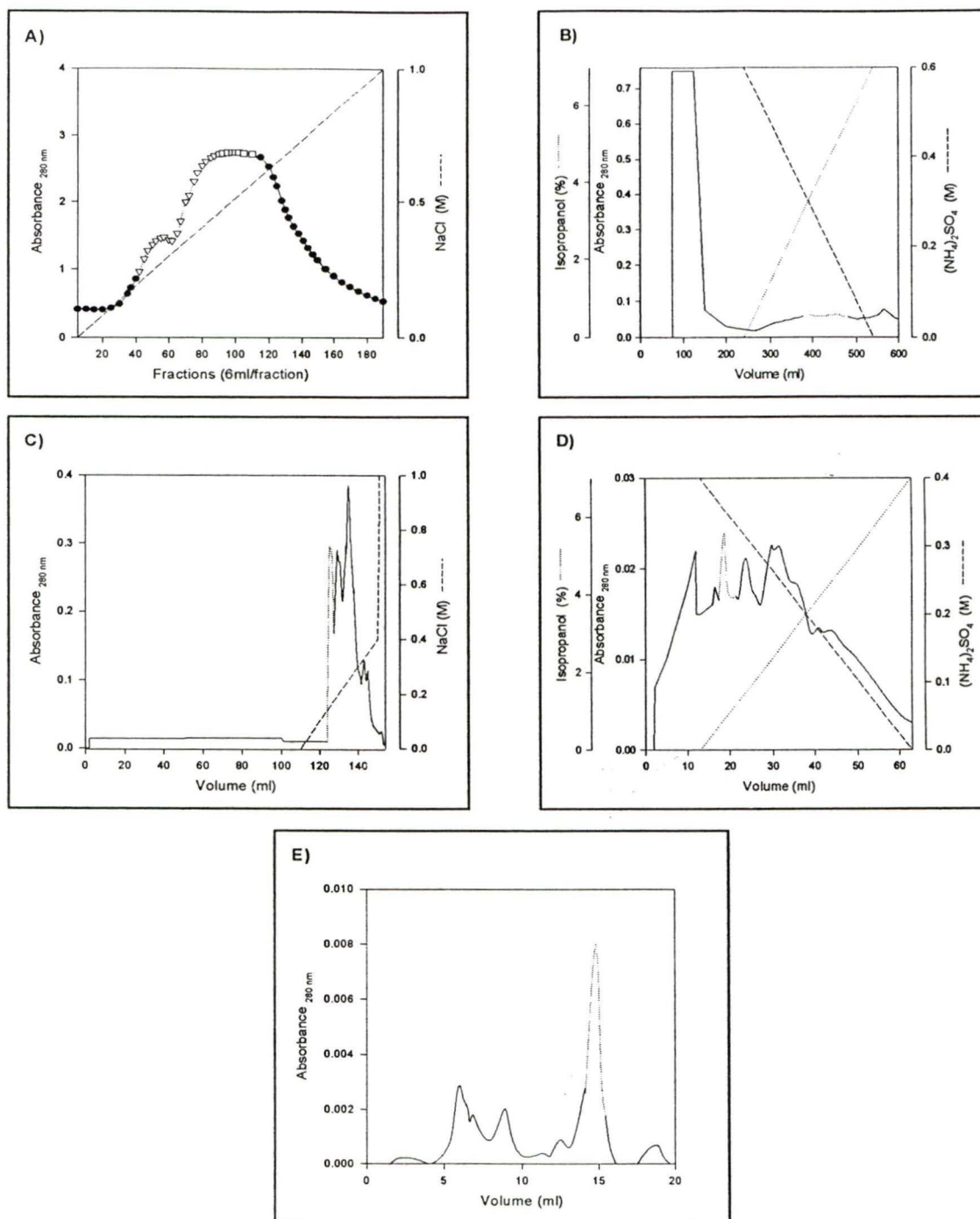


Figure 6 : Chromatogrammes de purification de la xylanase. A) DEAE-Sephadex, fractions actives: xylanase (∇) et xylosidase (\square); B) Phényl-Sepharose "Fast Flow"; C) MonoQ; D) Phényl-Superose et E) Superose12. La région de la courbe d'absorbance à 280 nm qui est tracée en pointillé indique où l'activité de la xylanase (et aussi de la xylosidase en A) a été détectée.

3.2.4. Purification de la xylosidase

La xylosidase a été purifiée jusqu'à homogénéité par les étapes de purification indiquées au tableau VI. L'activité spécifique obtenue est de 30 U/mg et pouvait varier de 24 à 35 U/mg. Le rendement est de 5.5% et 70 µg de protéines purifiées 167 fois sont récupérées à la fin de la purification.

La figure 7 montre les chromatogrammes requis pour cette purification.

TABLEAU VI. Purification de la xylosidase

Étape de purification	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	40	225	0.18	—	—
DEAE-Sephadex A-50	40	20	2	99	10
Phényl-Sepharose FF	29	2.2	13	72	72
Mono Q HR 5/5	5.3	0.39	13.6	13	75
Phényl-Superose HR 5/5	4.3	0.2	21.5	11	120
Superose 12	2.2	0.07	30	5.5	167

L'activité a été dosée tel que décrit au point 2.2. Les protéines ont été dosées tel que décrit au point 2.4.

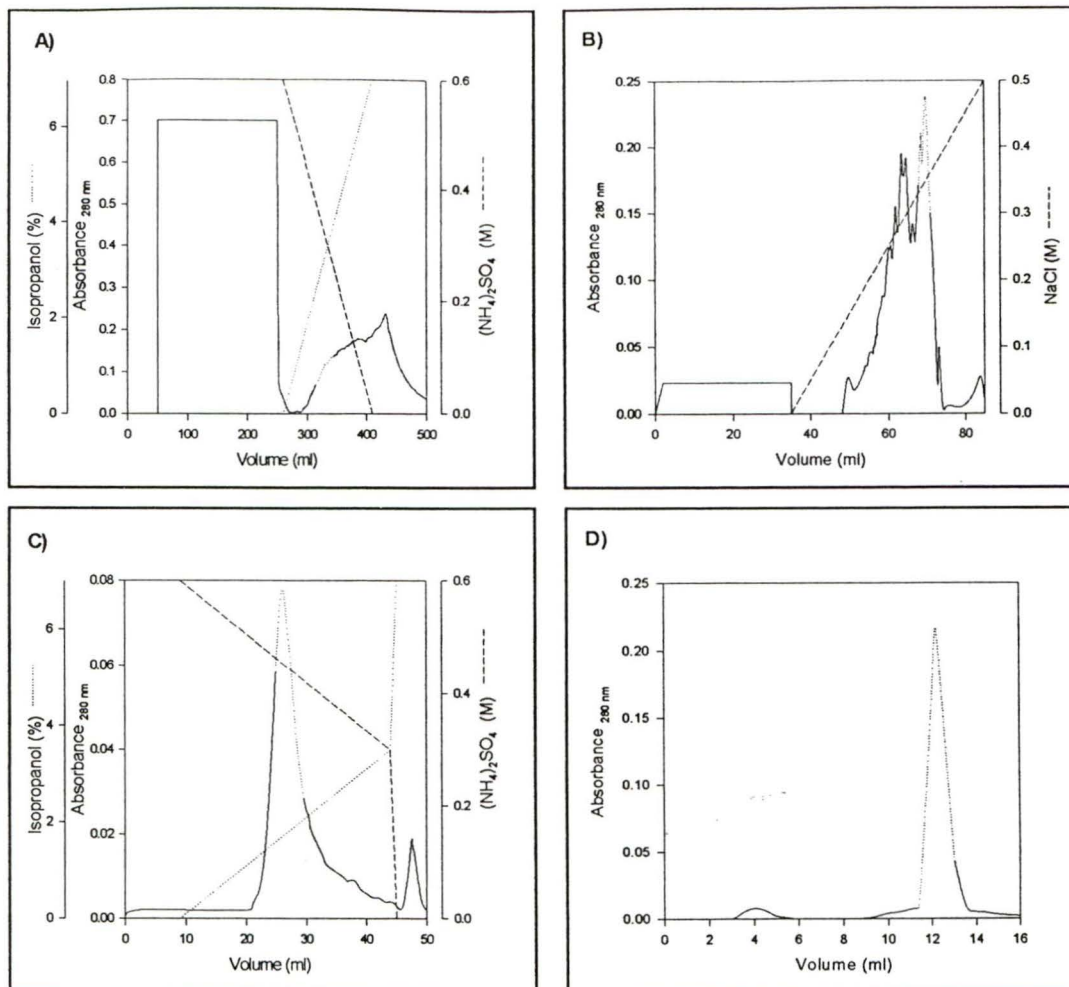


Figure 7 : Chromatogrammes de la purification de la xylosidase. La première étape de purification était l'élution sur DEAE-Sephadex (Figure 6A). Les étapes subséquentes sont: A) Phényl-Sepharose "Fast Flow"; B) Mono Q; C) Phényl-Superose et D) Superose12. La région de la courbe d'absorbance à 280 nm qui est tracée en pointillé indique où l'activité de la xylosidase a été détectée.

3.3. Caractérisation de la galactosidase et de la mannanase

3.3.1. Masse moléculaire

La masse moléculaire de la galactosidase et de la mannanase (les mannanases B et C) est de 82 ± 5 kDa et de 73 ± 6 kDa respectivement. Ceci d'après l'estimation à partir de gels SDS-polyacrylamide comme celui de la figure 8. La piste contenant la mannanase A montre deux bandes protéiques, une correspondant à $58,3 \pm 5,4$ kDa et l'autre correspondant à la masse moléculaire des mannanases B et C (73 ± 6 kDa). L'intensité relative de ces deux dernières bandes variait selon les expériences de purification. La galactosidase purifiée après 6 jours d'induction a la même masse moléculaire que celle purifiée après 2 jours d'induction.

La galactosidase, d'après un gel de polyacrylamide sous conditions non dénaturantes et non réductrices (figure 9), a une masse moléculaire de 247 ± 13 kDa; ce qui suggère que cette enzyme se retrouve sous forme trimérique. La mannanase B, elle, serait dimérique puisque sa migration sur gel de polyacrylamide sous conditions non dénaturantes et non réductrices (figure 9) coïncide avec une protéine d'une masse moléculaire de $162,2 \pm 9,5$ kDa.

L'écart-type des masses moléculaires des protéines a été déterminée par régression linéaire de la masse moléculaire des protéines de référence (décrites aux figures 8 et 9) par rapport à la distance de migration sur gel de polyacrylamide (3 déterminations par protéine).

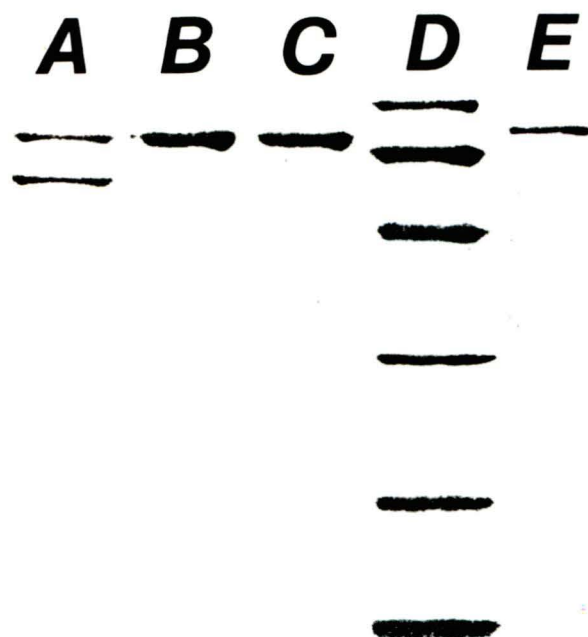


Figure 8 : Migration des mannanase et galactosidase en gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide. Puits A: mannanase A; puits B: mannanase B; puits C: mannanase C; puits D: protéines de référence (kDa): phosphorylase *b* (97.4), albumine bovine (66.2), ovalbumine (45), anhydrase carbonique (31.0), inhibiteur de trypsine (21.5) et lysozyme (14.4) et puits E: galactosidase purifiée après 2 jours d'induction.



Figure 9: Migration des galactosidase et mannanase en gel d'électrophorèse de polyacrylamide sous conditions non réductrices et non dénaturantes. Puits A et D: Protéines de référence (kDa): thyroglobuline (669), ferritine (440), catalase (232), lactate déshydrogénase (140) et albumine bovine (67); puits B: mannanase B; puits C: galactosidase purifiée après 2 jours d'induction.

Les xylosidase et xylanase purifiées ont une masse moléculaire identique à celles observées par Arezki Azzi, soit respectivement de 75 kDa et de 41 kDa (Azzi, 1991). La figure 10 montre que ces protéines sont suffisamment homogènes pour être microséquencées en transférant sur membrane PVDF.

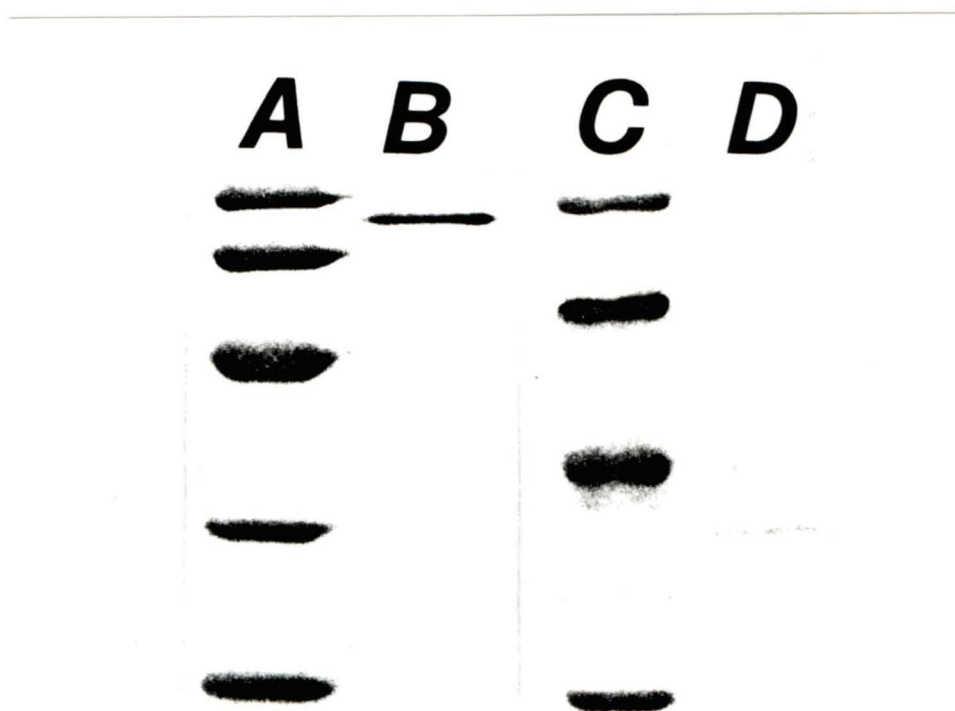


Figure 10 : Migration des xylanase et xylosidase en gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide. Puits B: xylosidase, puits D: xylanase. Puits A et C: protéines de référence (kDa): phosphorylase *b* (97.4), albumine bovine (66.2), ovalbumine (45), anhydrase carbonique (31.0), inhibiteur de trypsine (21.5) et lysozyme (14.4).

3.3.2. pH optimal et point isoélectrique

Les profils de pH indiqués à la figure 11 montrent que la galactosidase a un pH maximal entre 7.0 et 7.5 tandis que la mannanase a une activité optimale aux pH 5.5 à 7.5.

Le point isoélectrique de la galactosidase et des mannanases B et C a été estimé à partir du gel d'isoélectrofocalisation de la figure 12. Le pI de la galactosidase se situe entre les pH 5.4 à 5.9 et celui de la mannanase B ou C se situe entre les pH 5.9 à 6.5. Les protéines n'ont pas migré en une seule bande.

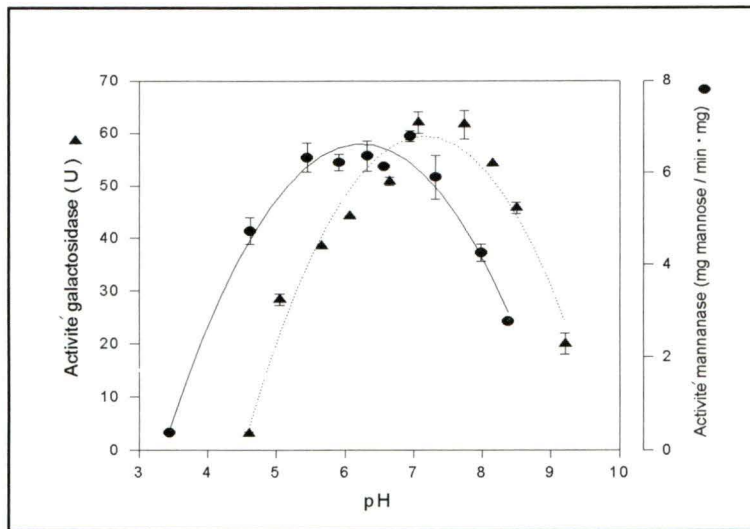


Figure 11 : pH optimal de la mannanase et de la galactosidase. Les enzymes sont incubées dans des tampons citrate/phosphate comme décrit dans matériels et méthodes.



Figure 12 : Isoélectrofocalisation des galactosidase et mannanases. Puits A: galactosidase; puits B et C: protéines de référence (pI): phycocyanine, 4.65 ; β -lactoglobuline, 5.10; anhydrase carbonique bovine, 6.00; anhydrase carbonique humaine, 6.50; myoglobine équine, 7.00; myoglobine de baleine, 8.05; α -chymotrypsine, 8.80; cytochrome c, 9.60; puits D et E: mannanase B; puits F et G: mannanase C.

3.3.3. Cinétique de la galactosidase

Tel qu'illustré à la figure 13, les études de cinétique de la galactosidase utilisant le p-nitrophényl α -D-galactopyranoside comme substrat montrent une linéarité de la représentation de Lineweaver-Burke. Une vitesse maximale (V_{\max}) de 195 ± 10 U/mg et une constante d'affinité de Michaelis (K_m) de 0.25 ± 0.02 mM ont été évaluées. Les vitesses initiales ont été déterminées en compilant quatre expériences effectuées en triplicata. L'erreur sur le V_{\max} et le K_m a été calculée par régression linéaire de la représentation de Lineweaver-Burke suivie du calcul de l'erreur sur l'ordonnée à l'origine et sur la pente.

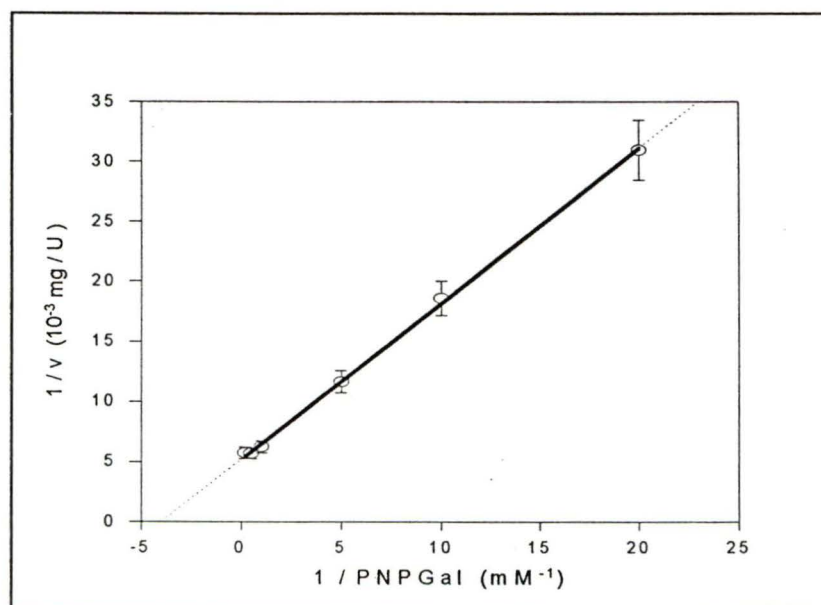


Figure 13 : Représentation de Lineweaver-Burke de la cinétique de la galactosidase.

3.3.4. Cinétique de la mannanase

La représentation de Lineweaver-Burke des études de cinétique de la mannanase envers la gomme de caroube (LBG) comme substrat est illustrée à la figure 14. La courbe est linéaire jusqu'à une concentration en substrat de 5 mg/ml, puis la vitesse initiale diminue avec des concentrations de substrat de plus en plus élevées. Un K_m de 1.5 ± 0.3 mg/ml et un V_{max} de 455 ± 60 U/mg ont été estimés en utilisant la région linéaire de la représentation de la figure 14. Les vitesses initiales ont été déterminées en compilant deux expériences effectuées en duplicata. L'erreur sur le V_{max} et le K_m a été calculée par régression linéaire de la représentation de Lineweaver-Burke suivie du calcul de l'erreur sur l'ordonnée à l'origine et sur la pente.

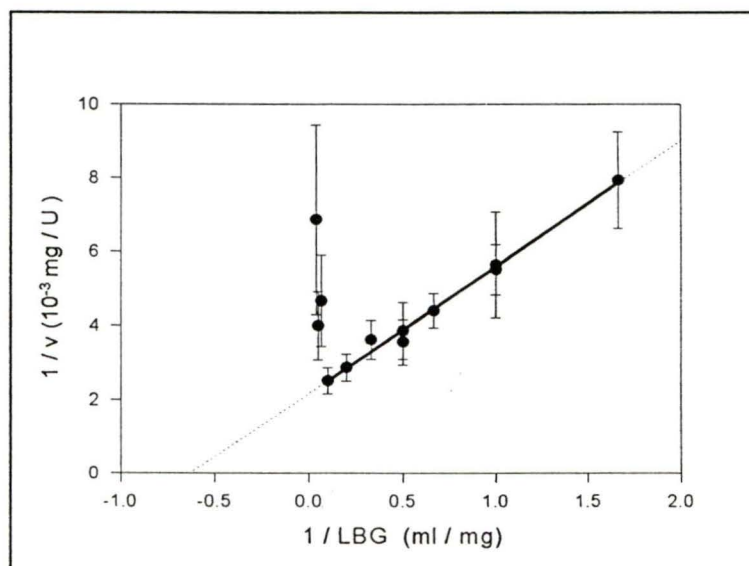


Figure 14 : Représentation de Lineweaver-Burke de la cinétique de la mannanase.

3.3.5. Spécificité de la galactosidase

L'activité de la galactosidase envers divers substrats a été comparée à celle obtenue avec le PNPGal. L'activité relative envers un substrat donné est exprimée en pourcentage par rapport à 100% d'activité arbitrairement donné pour le PNPGal (c'est le pourcentage du ratio des activités ramenées en $\mu\text{mol}/\text{min}$). La galactosidase est hautement spécifique pour le *p*-nitrophényl α -D-galactopyranoside (PNPGal) et montre peu d'activité envers des substrats à degré de polymérisation élevé comme la LBG et la gomme de guar, tel que décrit dans le tableau VII. En effet, la galactosidase n'est active que de 1.4% envers la gomme de guar et que de 0.2% envers la LBG. Il est important que le galactopyranose soit sous la forme anomérique α puisque le substrat *p*-nitrophényl β -D-galactopyranoside n'est pas hydrolysé par la galactosidase (voir le tableau VII). Le mélibiose, le stachyose et le raffinose sont aussi très peu hydrolysés par la galactosidase: soit respectivement de 3%, 2.3% et 0.2%.

TABLEAU VII. Spécificité de la galactosidase

Substrat	Activité relative (%)
PNP α -D-Gal	100
Mélibiose	3
Stachyose	2.3
gomme de guar	1.4
gomme de caroube (LBG)	0.2
Raffinose	0.2
PNP β -D-Gal	0

Les essais ont été effectués tel que décrit au point 2.6.2. L'activité relative est le pourcentage d'activité pour un substrat particulier par rapport à l'activité envers le PNP α -D-Gal.

3.3.6. Spécificité de la mannanase

L'activité de la mannanase envers divers substrats a été comparée à celle obtenue avec la LBG. L'activité relative envers un substrat donné est exprimée en pourcentage par rapport à 100% d'activité arbitrairement donné pour la LBG (pourcentage du ratio des activités ramenées en $\mu\text{mol}/\text{min}$). La mannanase semble être spécifique aux liens glycosidiques β -1,4 et aux résidus mannoses des galactomannanes. Le tableau VIII montre que la mannanase n'est active que sur des substrats de galactomannanes comme la LBG et la gomme de guar. La gomme de guar n'est hydrolysée qu'à 15% du taux obtenu pour la LBG. Aucune activité n'est détectée sur les substrats suivants: la mannane de *Saccharomyces*

cerevisiae (polymère de mannose avec des liens glycosidiques α -1,2, α -1,3 et α -1,6), la xylane d'avoine, le sigmacell, l'avicel, le carboxyméthyl cellulose et le *p*-nitrophényl β -D-mannopyranoside.

TABLEAU VIII. Spécificité de la mannanase

Substrat	Activité relative (%)
gomme de caroube (LBG)	100
gomme guar	15
mannane de <i>S. cerevisiae</i>	0
PNP β -D-mannoside	0
xylane (avoine)	0
sigmacell	0
carboxyméthyl cellulose	0
avicel	0

Les essais ont été effectués tel que décrit au point 2.6.2. L'activité relative est le pourcentage d'activité pour un substrat particulier par rapport à l'activité envers la LBG.

3.3.7. Mode d'action de la mannanase

L'élution des produits d'hydrolyse de la LBG par la mannanase est représentée à la figure 15. Des di- et trisaccharides sont présents en majorité avec un peu de monosaccharides et d'autres oligosaccharides. Ces produits sont le résultat d'une digestion par une enzyme ayant un mode d'action endo, comme discuté au prochain chapitre.

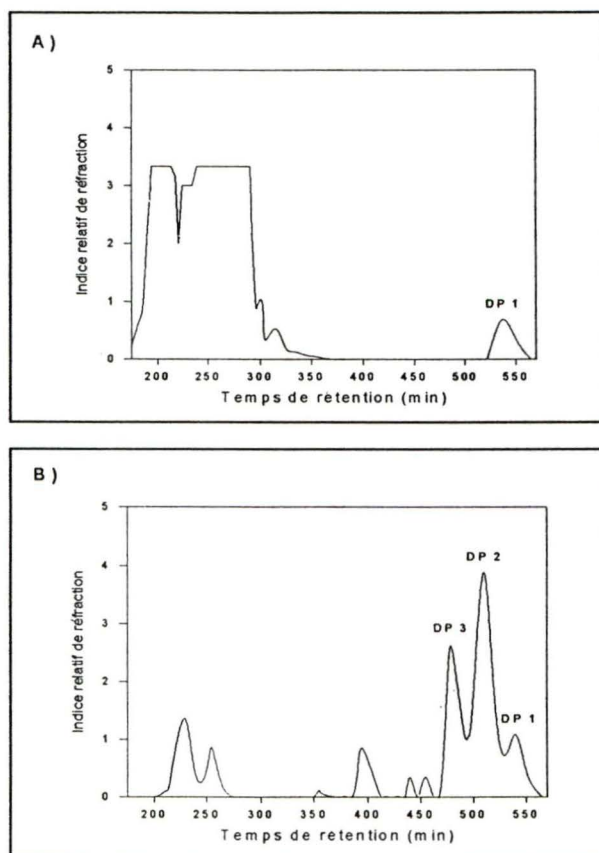


Figure 15 : Chromatographie (Bio-Gel P-4) des produits d'hydrolyse de la mannanase. A) Substrat (LBG) avant l'incubation en présence de mannanase et B) Patron d'élution après 48 heures à 55°C en présence de mannanase.

3.3.8. Thermostabilité de la galactosidase

La figure 16 montre le résultat des études de thermostabilité de la galactosidase en absence de substrat. Une préincubation à 60°C pour des périodes de temps allant jusqu'à 24 heures ne diminue pas ou très peu l'activité de la galactosidase. L'activité restante est de 70% lorsque l'enzyme est préincubée durant 24 heures à 65°C. À une température de 68°C, l'enzyme perd son activité plus rapidement; 70% de l'activité initiale est perdue après 90 minutes de préincubation.

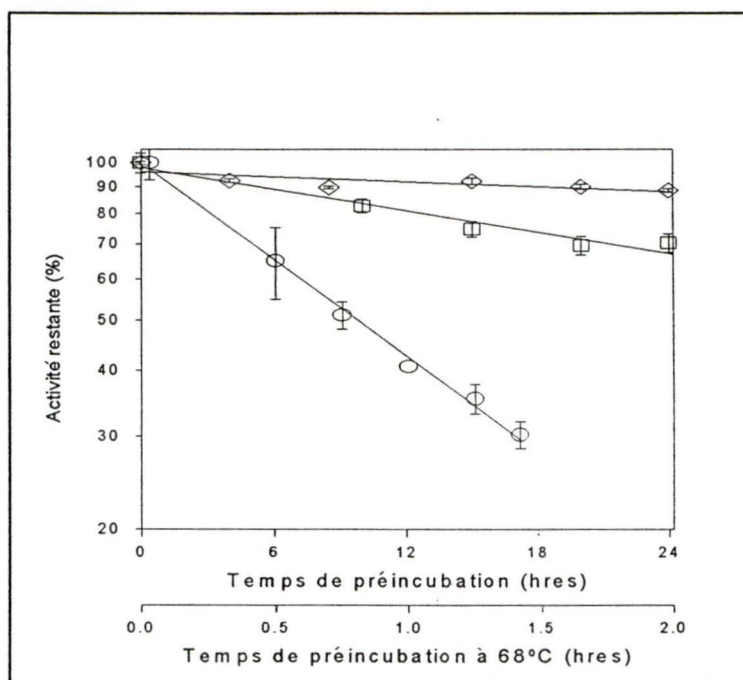


Figure 16 : Thermostabilité de la galactosidase. L'enzyme a été préincubée à 60°C (◇), 65°C (□) et 68°C (○) pour des périodes de temps diverses. L'activité résiduelle a alors été immédiatement dosée à 55°C tel que décrit dans la section Matériels et méthodes.

3.3.9. Thermostabilité de la mannanase

Des études de thermostabilité de la mannanase, similaires à celles faites sur la galactosidase, sont représentées à la figure 17. La mannanase est stable à une température de 65°C pour au moins 24 heures. Environ 90% de son activité initiale est conservée à 70°C après 24 heures de préincubation. Moins de 10% de l'activité de la mannanase demeure après 90 minutes de préincubation à 75°C.

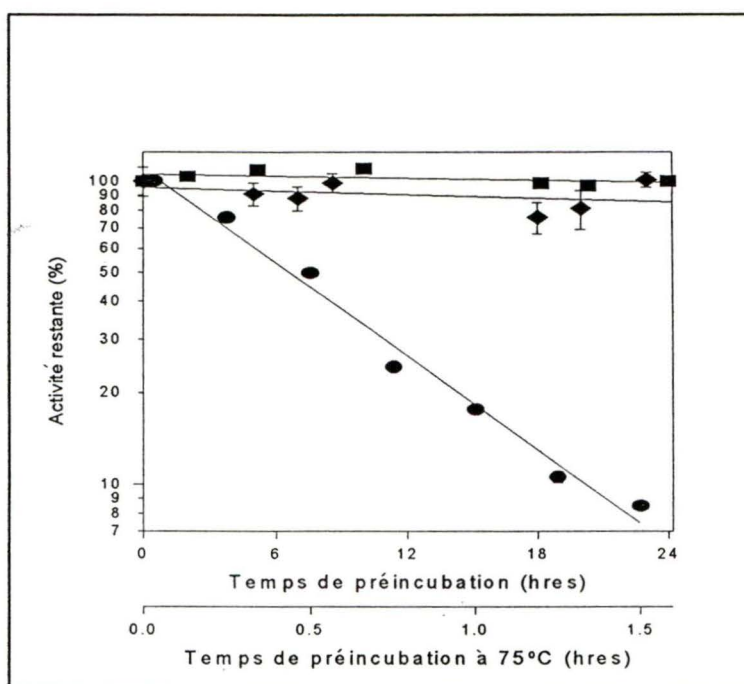


Figure 17 : Thermostabilité de la mannanase. L'enzyme a été préincubée à 65°C (■), 70°C (◆) et 75°C (●) pour des périodes de temps diverses. L'activité résiduelle a alors été immédiatement dosée à 55°C tel que décrit dans la section Matériels et méthodes.

3.4. Clonage des hémicellulases

3.4.1. Préparation de l'ADN génomique

La figure 18 montre la qualité de l'ADN génomique isolé de la bactérie d'origine *B. stearrowthermophilus* NCA 2184 (ATCC). L'ADN isolé est de haute masse moléculaire (supérieure ou égale à 23 kb). Les figures 19 et 20 montrent l'ADN génomique digéré partiellement par les enzymes de restriction *Hind*III ou *Eco*RI respectivement qui a été fractionné par gradient de sucrose afin d'être sélectionné pour une taille de 2 à 10 kb. Les fractions 2, 3 et 4 ont été utilisées pour insérer dans le vecteur pUC18 pour l'ADN digéré par *Eco*RI (figure 19). L'ADN digéré par *Hind*III de 2 à 10 kb se retrouvait dans les fractions 2 à 6 inclusivement (figure 20).



Figure 18 : ADN génomique de *Bacillus stearothermophilus*. Gel d'agarose 0.5%; A: 0.1 μ l; C: 1 μ l; D: 0.5 μ l et B: produits de digestion du phage lambda par *Hind*III (23, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03 et 0.56 kb).

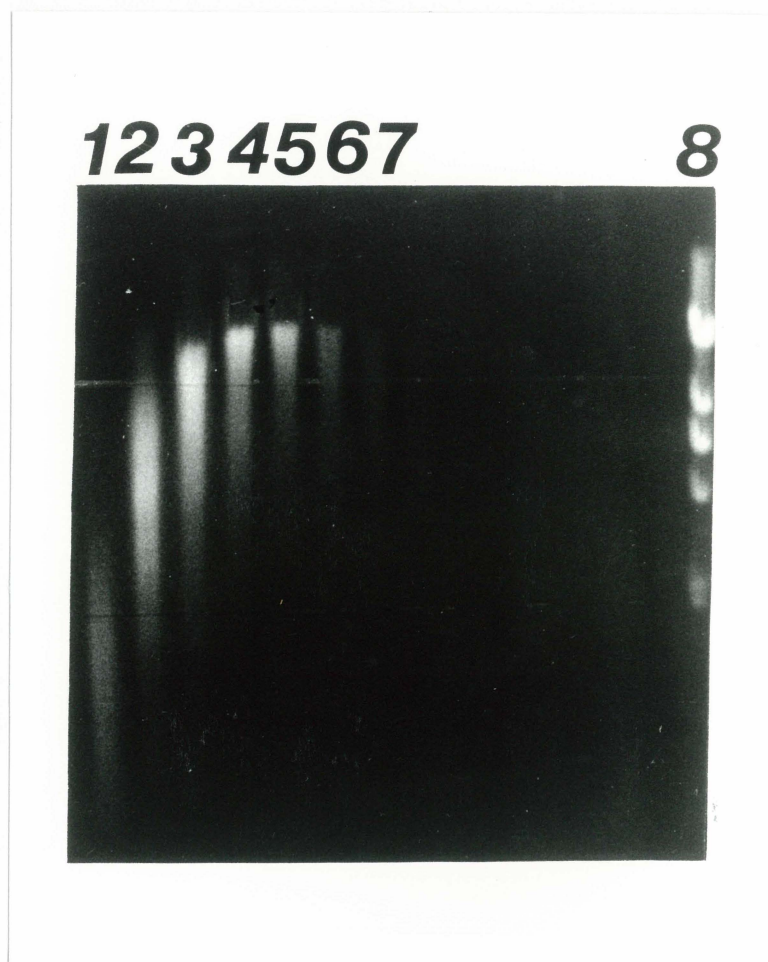


Figure 19 : Fractionnement de l'ADN génomique par gradient de sucrose. Gel d'agarose montrant la taille de l'ADN partiellement digéré par *EcoRI* obtenu après ultracentrifugation par gradient de sucrose 10-40%. Puits 1 à 7: ADN du haut vers le bas du tube. Puits 8: produits de digestion du phage lambda par *HindIII* (23, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03 et 0.56 kb).



Figure 20 : Fractionnement de l'ADN génomique par gradient de sucrose. Gel d'agarose montrant la taille de l'ADN partiellement digéré par *Hind*III obtenu après ultracentrifugation par gradient de sucrose 10-40%. Puits 1 à 7: ADN du haut vers le bas du tube. Puits 8: produits de digestion du phage lambda par *Hind*III (23, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03 et 0.56 kb).

3.4.2. Criblage des bibliothèques d'ADN génomique

La souche de *E. coli* DH5 α MCR a été transformée par l'ADN génomique digéré et ligué dans le vecteur pUC18. Les bibliothèques qui en résultent sont constituées de 10,000 recombinants pour le site de clonage *EcoRI* et de 22,000 recombinants pour le site de clonage *HindIII*.

Le tableau IX indique le nombres de clones positifs obtenus lors des criblages de ces bibliothèques afin de retrouver des clones ayant l'activité enzymatique recherchée (galactosidase, mannanase, xylanase ou xylosidase selon le substrat utilisé dans les pétris). Deux criblages de 10,000 colonies chacun ont permis de détecter six colonies présentant une activité galactosidase. La figure 21 montre l'activité galactosidase qui est révélée sur pétri indicateur (voir le point 2.8.1) pour deux colonies positives au centre et deux colonies négatives en haut et en bas. Le criblage de la bibliothèque ayant comme site de clonage *HindIII* n'a pas été effectué.

Le criblage avec la bibliothèque *EcoRI* pour détecter une activité mannanase a donné huit zones d'éclaircissement. Les colonies de ces zones d'éclaircissement ont été testées sur pétri indicateur (voir le point 2.8.2.) afin d'isoler la colonie positive. La figure 22 illustre l'éclaircissement obtenu pour révéler la positivité d'un clone mannanase purifié. La bibliothèque avec le site de clonage *HindIII* n'a donné lieu à aucune colonie positive. Plus de 60,000 colonies ont été étalées à cette fin mais sans succès.

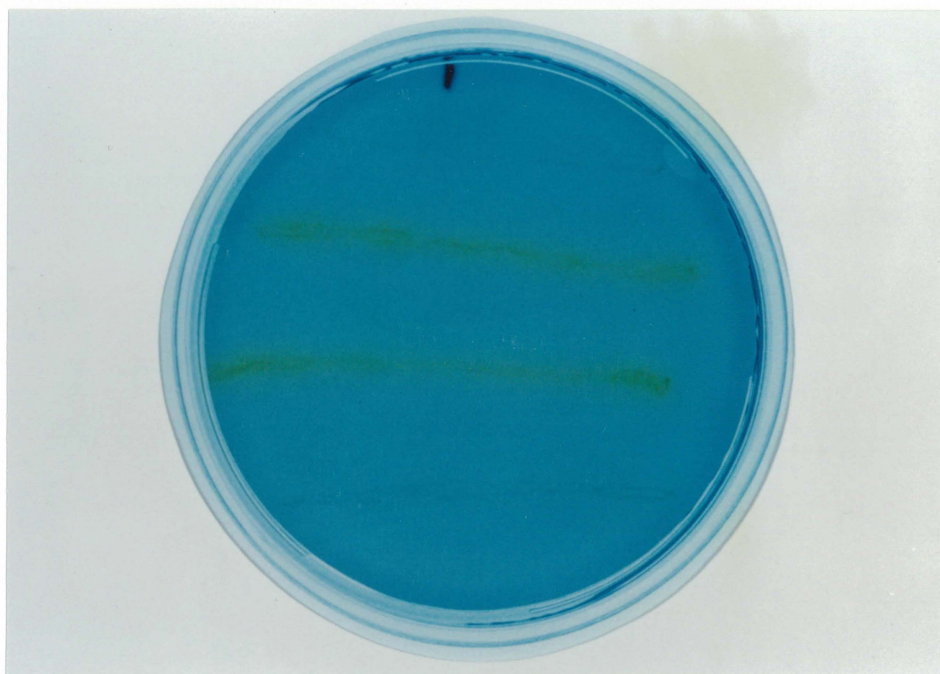


Figure 21 : Test de positivité des clones galactosidases. Les colonies positives (deux lignes centrales) ainsi que deux colonies négatives (haut et bas) ont été étalées sur pétri LB-Ampicilline puis elles ont été répliquées sur une membrane de nylon. Après 1 heure à 60°C, la membrane a été mise sur de l'agarose contenant le substrat PNPGal pour quelques minutes afin de révéler l'activité (Détails dans matériels et méthodes).

Des colonies positives pour l'activité xylanase ont été isolées des deux bibliothèques (*EcoRI* et *HindIII*). Deux halos d'éclaircissement ont été identifiés lors du criblage de la bibliothèque ayant pour site de clonage *EcoRI* et un seul halo a été détecté lors du criblage de la bibliothèque *HindIII*. Des colonies positives sont montrées à la figure 23.

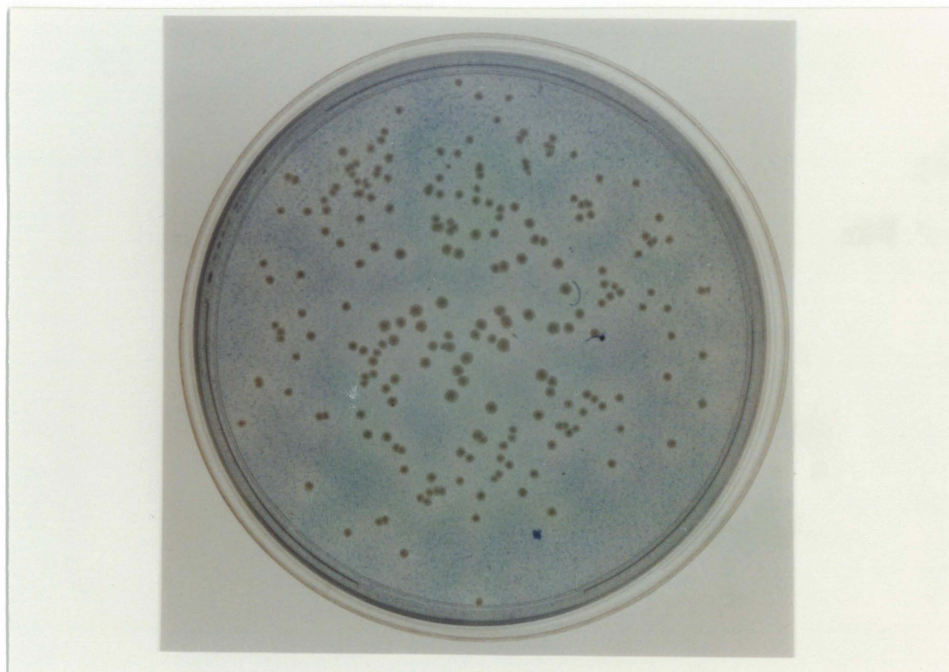


Figure 22 : Zones d'éclaircissement obtenues par les clones mannanases.

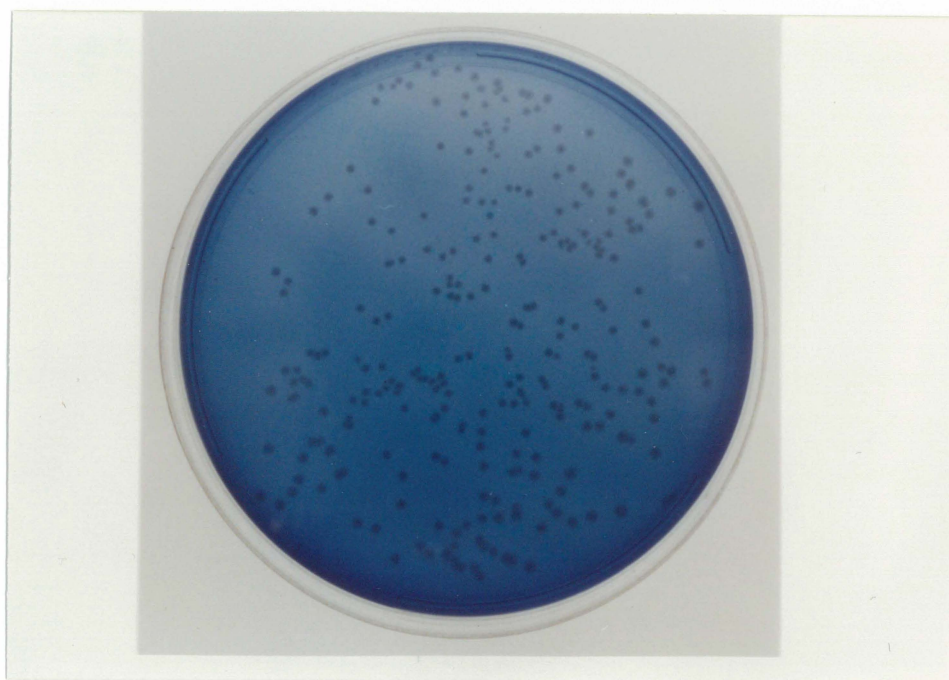


Figure 23 : Zones d'éclaircissement obtenues par les clones xylanases.

Les clones positifs pour l'activité xylosidase ont été isolés de la bibliothèque *EcoRI* et sont au nombre de trois. Un étalement des colonies positives sur pétri indicateur, avec le PNPXyl comme substrat, donne la même coloration que pour les colonies galactosidases positives (V. figure 21). Étant donné la petite taille de l'insert de deux de ces clones (voir le point suivant ou le tableau IX), l'activité xylosidase n'a pas été criblée dans la bibliothèque *HindIII*.

Il est à noter que chaque type de clones donnait un éclaircissement à un taux de diffusion semblable.

TABLEAU IX. Clonage des hémicellulases

Site de clonage	Nombre de recombinants	Activité sélectionnée	Nombre de clones positifs	Taille des inserts (kb)
<i>EcoRI</i>	10,000	Galactosidase	4 et 2*	6.3
		Mannanase	8	19, 11.1 et 7.8
		Xylanase	2	4.2
		Xylosidase	3	2.7
<i>HindIII</i>	22,000	Galactosidase	ND**	-
		Mannanase	0	-
		Xylanase	1	6.7
		Xylosidase	ND**	-

*Deux étalements différents de 10,000 colonies

**ND, non déterminé

La taille des inserts a été déterminée par une extraction de l'ADN plasmidique de chaque clone positif par lyse alcaline tel que décrit dans la section Matériels et méthodes suivie d'une digestion au site de clonage et de l'analyse sur gel d'agarose (voir figure 24).

3.5. Caractérisation des clones

3.5.1. Analyse de l'ADN plasmidique des clones

Les figures 24 à 30 montrent les préparations de l'ADN plasmidique des clones positifs qui ont été analysées sur gel d'agarose 0.7%. Les préparations d'ADN plasmidiques ont été analysées en digérant par l'enzyme de restriction clivant au site de clonage, soit *EcoRI* ou *HindIII* selon le cas. Cela a permis de déterminer la taille des inserts laquelle est indiquée au tableau IX.

L'ADN plasmidique des six clones galactosidase est de même taille d'après une migration des échantillons d'ADN digérés par *EcoRI* sur gel d'agarose. Les inserts ont une taille correspondant à 6.3 kilobases (kb) et on remarque une bande de 2.9 kb migrant à la même hauteur que le vecteur de clonage, le pUC18, également digéré par *EcoRI* (voir la figure 24). Le plasmide n'a donc que deux sites de clivage, de part et d'autre de l'insert, au site de clonage.

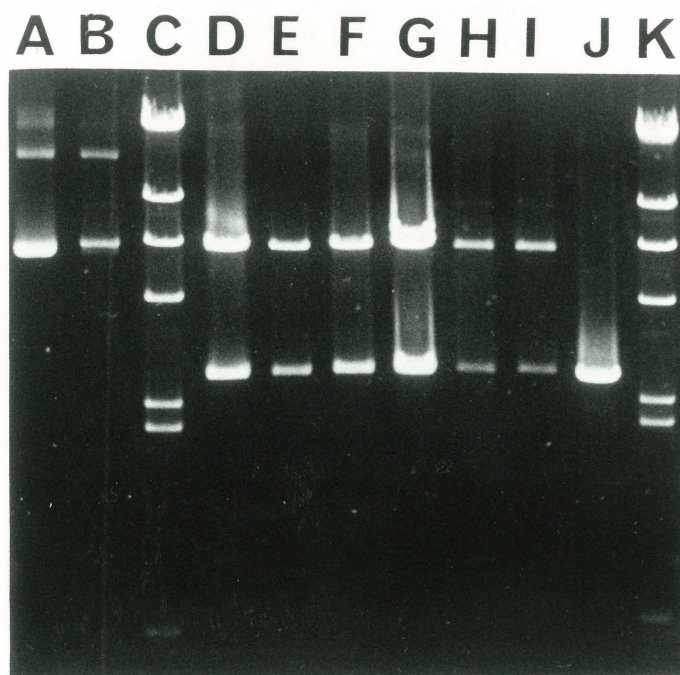


Figure 24 : Gel d'agarose de l'ADN plasmidique des clones galactosidase digéré par *EcoRI*. Puits A et B: Gal1a et Gal1b non digérés; puits C et K: lambda digéré par *HindIII*; puits D à I: Gal1a, Gal2a, Gal3, Gal4, Gal1b et Gal2b respectivement; puits J: pUC18.

La taille de l'insert codant pour l'activité galactosidase a été réduite à 4.0 ± 0.1 kb en digérant l'ADN plasmidique du clone Gal1b par les enzymes de restriction *EcoRI* et *KpnI* (figure 25). Ce fragment, sous-cloné également dans pUC18 aux sites *EcoRI* et *KpnI*, a donné lieu à un nouveau clone appelé Gal1c (figure 26). L'activité galactosidase du clone Gal1c a été comparée, comme montré au tableau X. Ce clone peut encore être tronqué de 0.7 kb en procédant à une digestion par l'enzyme de restriction *PstI* (V. figure 27). Le sous-clonage n'a pas été fait, cependant. Il serait intéressant de vérifier l'activité galactosidase associée à ces fragments.

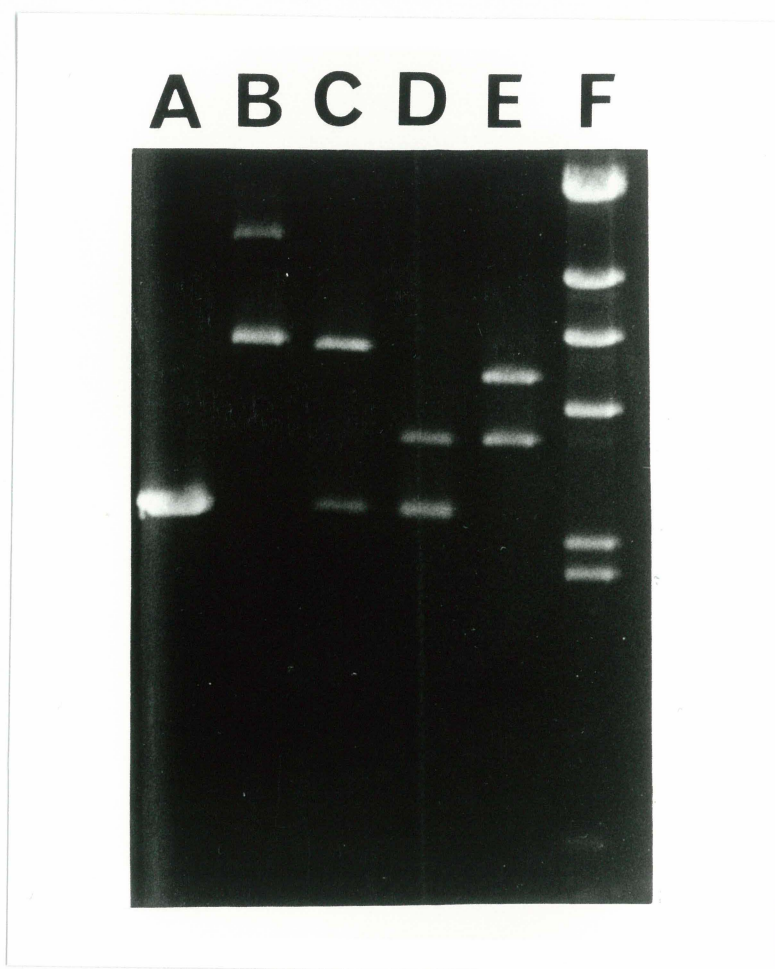


Figure 25 : Sous-clonage d'un fragment de 4 kb codant pour une activité galactosidase: Analyse par gel d'agarose de l'ADN plasmidique d'un clone galactosidase. Puits A: pUC18 digéré par *EcoRI*; puits B: Gal1b non digéré; puits C: Gal1b digéré par *EcoRI*; puits D: Gal1b digéré par *EcoRI* et *KpnI*; puits E: Gal1b digéré par *KpnI*; puits F: lambda digéré par *HindIII*. Le fragment de 4 kb au puits D (le plus haut) est celui sous-cloné dans pUC18 digéré par *EcoRI* et *KpnI* (nommé Gal1c).

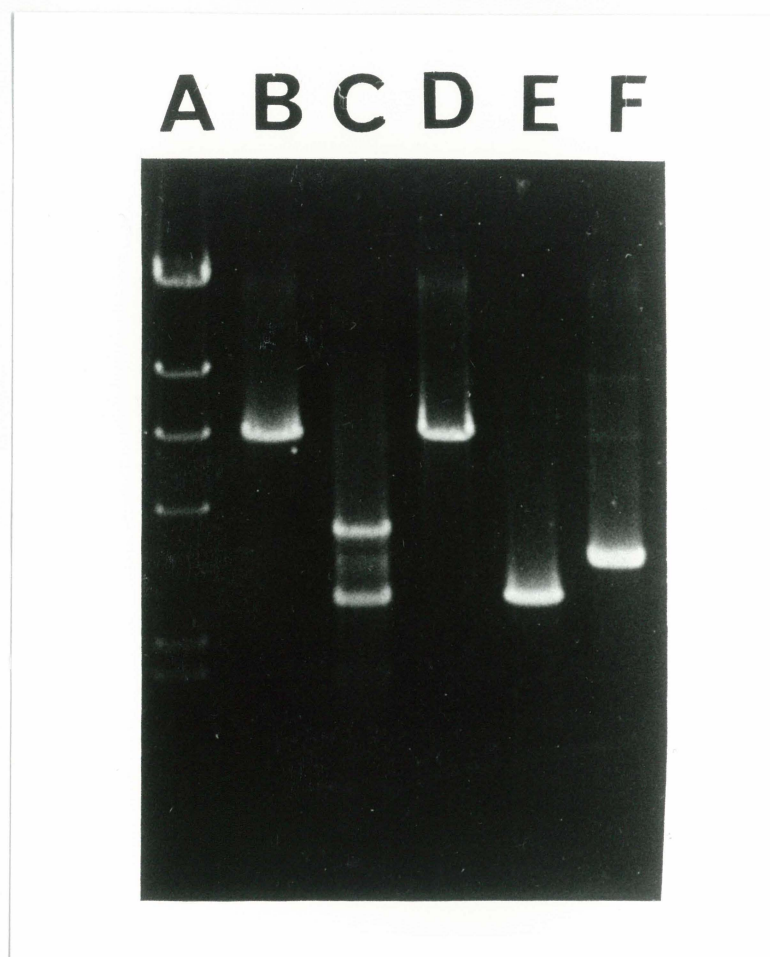


Figure 26 : Gel d'agarose de l'ADN plasmidique du clone Gal1c. Puits A: lambda digéré par *Hind*III; puits B: digestion *Eco*RI; puits C: digestion *Eco*RI et *Kpn*I; puits D: digestion *Kpn*I; puits E: pUC18 digéré par *Eco*RI; puits F: digestion *Pst*I.

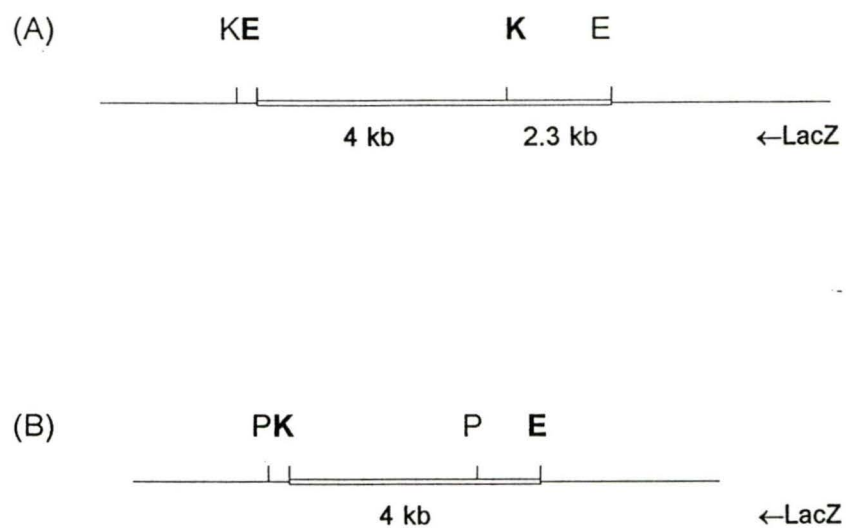


Figure 27 : Schéma de l'insert des clones Gal1b (A) et Gal1c (B). Les sites *KpnI* (K), *EcoRI* (E) et *PstI* (P) délimitent l'insert (==) et le vecteur pUC18 (—).

Les huit clones produisant une mannanase recombinante ont trois tailles différentes (voir la figure 28). À chaque échantillon d'ADN plasmidique digéré par *EcoRI*, on peut identifier une bande de 2.9 kb migrant comme le vecteur pUC18 linéarisé (digestion par *EcoRI*). Les inserts des clones Man1, Man2, Man3 et Man8 contiennent trois sites de restriction *EcoRI* donnant lieu à des ADN de 6.4 kb, 1.7kb, 1.6 kb et 1.4 kb de longueur. La taille de ces inserts est donc de 11.1 kb. L'insert du clone Man7 a aussi trois sites de restriction *EcoRI* puisque des bandes de 7.9, 6.4, 1.6 et 1.4 kb sont visibles sur le gel d'agarose (figure 28). L'insert du clone Man7 a donc une longueur de 19 kb. Les clones Man4, Man5 et Man6 ont un insert de 7.8 kb puisqu'une bande de 6.4 kb et une autre de 1.4 kb sont retrouvées sur gel d'agarose (figure 28). Tous les clones ont des bandes en commun suggérant qu'ils ont une ou des régions communes.

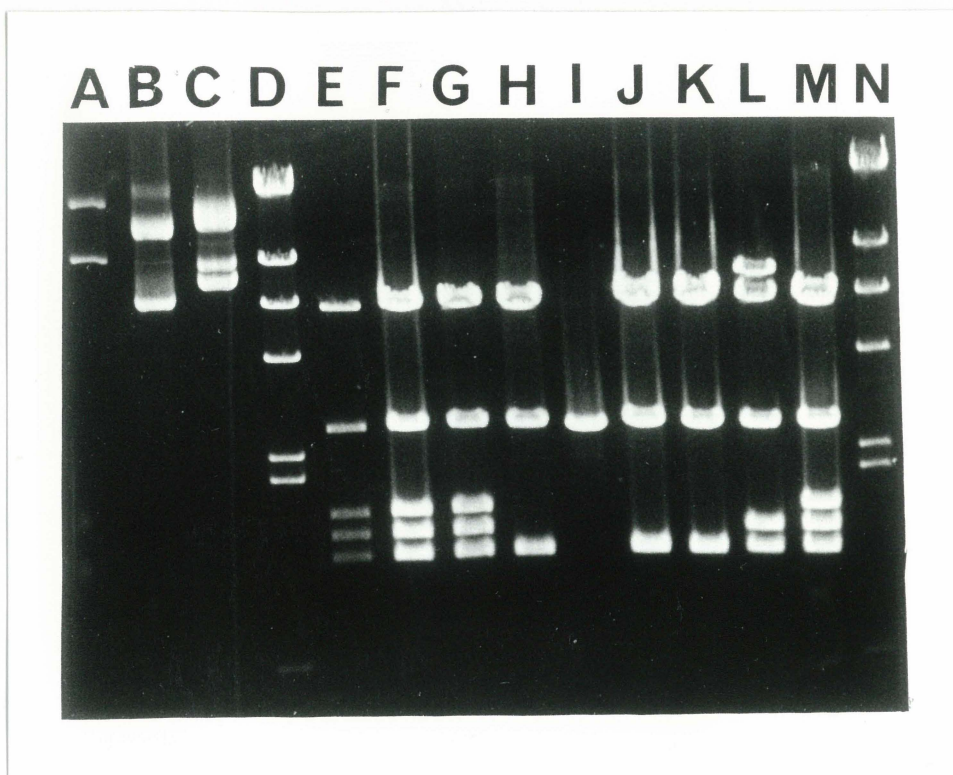


Figure 28 : Gel d'agarose de l'ADN plasmidique des clones mannanases digéré par *EcoRI*. Puits A: Man1 non digéré; puits B: Man4 non digéré; puits C: Man7 non digéré; puits D: lambda digéré *HindIII*; puits E: Man1; puits F: Man2; puits G: Man3; puits H: Man4; puits I: pUC18; puits J: Man5; puits K: Man6; puits L: Man7; puits M: Man8 et puits N: lambda digéré *HindIII*.

Pour ce qui est des clones xylanases, ils ont été retrouvés dans les deux bibliothèques d'ADN (sites *EcoRI* et *HindIII*). L'analyse des ADN plasmidiques des trois clones obtenus sur gel d'agarose montre que les 2 clones isolés de la bibliothèque *EcoRI* (XylA et XylB) ont un insert de 4.2 kb puisqu'une digestion par *EcoRI* donne des fragments de 2.5kb et 1.7kb et le clone XylC ayant le site de clonage *HindIII* a un insert de 6.7kb (figure 29).

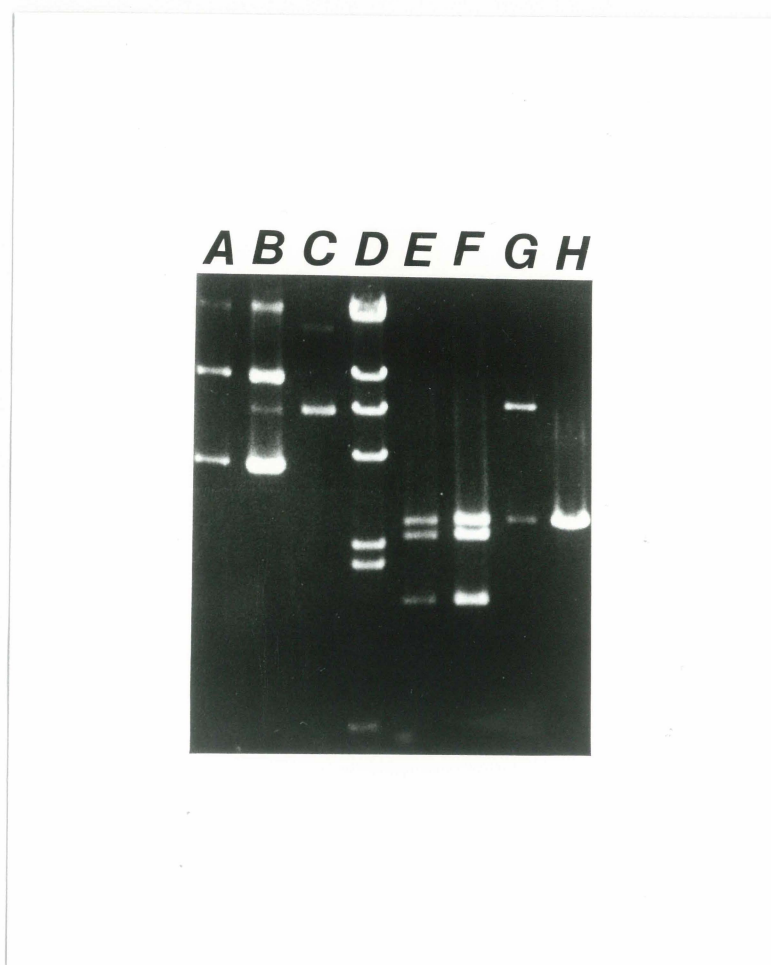


Figure 29 : Gel d'agarose de l'ADN plasmidique des clones xylanases. Puits A: XylA non digéré; puits B: XylB non digéré; puits C: XylC non digéré; puits D: lambda digéré *Hind*III; puits E: XylA digéré *Eco*RI; puits F: XylB digéré *Eco*RI; puits G: XylC digéré *Hind*III; puits H: pUC18 digéré *Eco*RI.

Le criblage pour une activité β -xylosidase dans les deux bibliothèques a permis d'isoler 3 clones, nommés Xylo1, Xylo2 et Xylo3, qui ont tous la même taille apparente d'insert de 2.5 kb et le site de clonage *EcoRI*. Aucun site *EcoRI* n'a été retrouvé dans l'insert d'après l'analyse sur gel d'agarose (figure 30).

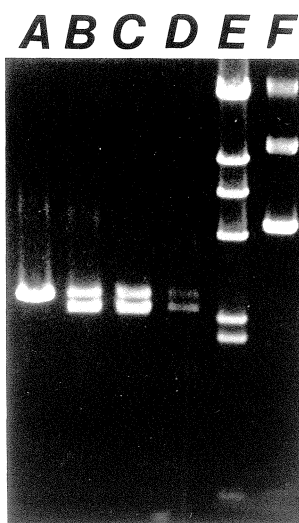


Figure 30 : Gel d'agarose de l'ADN plasmidique des clones xylosidases digéré par *EcoRI*. Puits A: pUC18; puits B: Xylo1; puits C: Xylo2; puits D: xylo3; puits E: lambda digéré *HindIII*; puits F: Xylo1 non digéré.

Il est à noter que des études de digestion par plusieurs enzymes de restriction avaient été envisagées; mais l'idée a été rejetée car le séquençage ultérieur des gènes des hémicellulases contenus dans les inserts permettra d'établir la localisation de ces sites.

3.5.2. Répartition de l'activité des hémicellulases

L'activité hémicellulase de chaque clone a été déterminée dans le milieu de culture (extracellulaire), le périplasme et le milieu intracellulaire. Le tableau X indique les proportions d'activité retrouvées afin de déterminer s'il y a ou non sécrétion dans le périplasme ou le milieu de culture. Le tableau XI indique le taux d'expression de l'activité des hémicellulases recombinantes et des hémicellulases originelles (de l'induction dans *B. stearothermophilus*).

TABLEAU X. Distribution de l'activité des hémicellulases

Clone	Pourcentage d'activité (%)		
	surchargeant	périplasme	intracellulaire
Galactosidase	5 ± 2	25 ± 8	70 ± 10
Galactosidase 4 kb	4 ± 2	20 ± 5	75 ± 7
Mannanase 1, 2, 3 et 8	ND*	62 ± 3	38 ± 3
Mannanase 4, 5 et 6	ND*	84 ± 4	15 ± 4
Mannanase 7	ND*	63 ± 2	36 ± 2
Xylanase A et B (<i>EcoRI</i>)	11 ± 6	26 ± 1	63 ± 3
Xylanase C (<i>HindIII</i>)	18 ± 12	23 ± 1	59 ± 10
Xylosidase 1 et 2	2.0 ± 0.5	10 ± 2	88 ± 3
Xylosidase 3	16 ± 4	47 ± 4	37 ± 2

*ND, non détectée

La préparation des fractions périplasmique, intracellulaire et extracellulaire a été répétée deux fois et les dosages d'activité enzymatique ont été produits en duplicata selon les protocoles décrits dans la section Matériels et méthodes (point 2.2.).

TABLEAU XI. Taux d'expression de l'activité des hémicellulases

Enzyme	Activité (U/ml de culture)	Taux d'expression (%)
Recombinante:		
Galactosidase	0.98 ± 0.28	1470 ± 425
Galactosidase 4 kb	0.44 ± 0.01	665 ± 13
Mannanase 1, 2, 3 et 8	0.31 ± 0.06	34 ± 6
Mannanase 4, 5, et 6	0.26 ± 0.03	29 ± 4
Mannanase 7	0.32 ± 0.02	35 ± 2
Xylanase A et B (<i>EcoRI</i>)	0.43 ± 0.05	95 ± 10
Xylanase C (<i>HindIII</i>)	0.50 ± 0.14	110 ± 30
Xylosidase 1 et 2	0.91 ± 0.26	1140 ± 325
Xylosidase 3	1.00 ± 0.2	1100 ± 200
Originale:		
Galactosidase	0.067	100
Mannanase	0.9	100
Xylanase (Azzi, 1991)	0.45	100
Xylosidase (Azzi, 1991)	0.08	100

L'activité des enzymes recombinantes est l'activité totale retrouvée dans les fractions périplasmique, intracellulaire et extracellulaire des bactéries transformées. L'activité a été déterminée à partir de 2 expériences indépendantes en duplicata et est exprimée en unités par ml de culture de bactéries incubées 18 heures à 37°C dans le milieu "DYT". Pour les enzymes produites dans *B. stearothermophilus* (enzyme originale), l'activité est celle retrouvée dans le milieu extracellulaire après induction dans le milieu minimal. Le taux d'expression est le pourcentage d'activité par rapport à l'activité retrouvée dans *B. stearothermophilus* (activité des enzymes originaux).

3.5.3. Activités in situ en électrophorèse (zymogrammes)

Des gels de polyacrylamide de 5 à 15% sous conditions non réductrices et non dénaturantes ont permis de déterminer la masse moléculaire des galactosidases et xylanases recombinantes (figures 31 et 33). Les figures 32 et 34 montrent des zymogrammes à partir de gels SDS-PAGE pour les mannanases et les xylosidases. Toutes les protéines recombinantes ont migré à la même position que la protéine homologue purifiée de *B. stearrowthermophilus*, qu'elles proviennent du périplasme ou du cytoplasme.

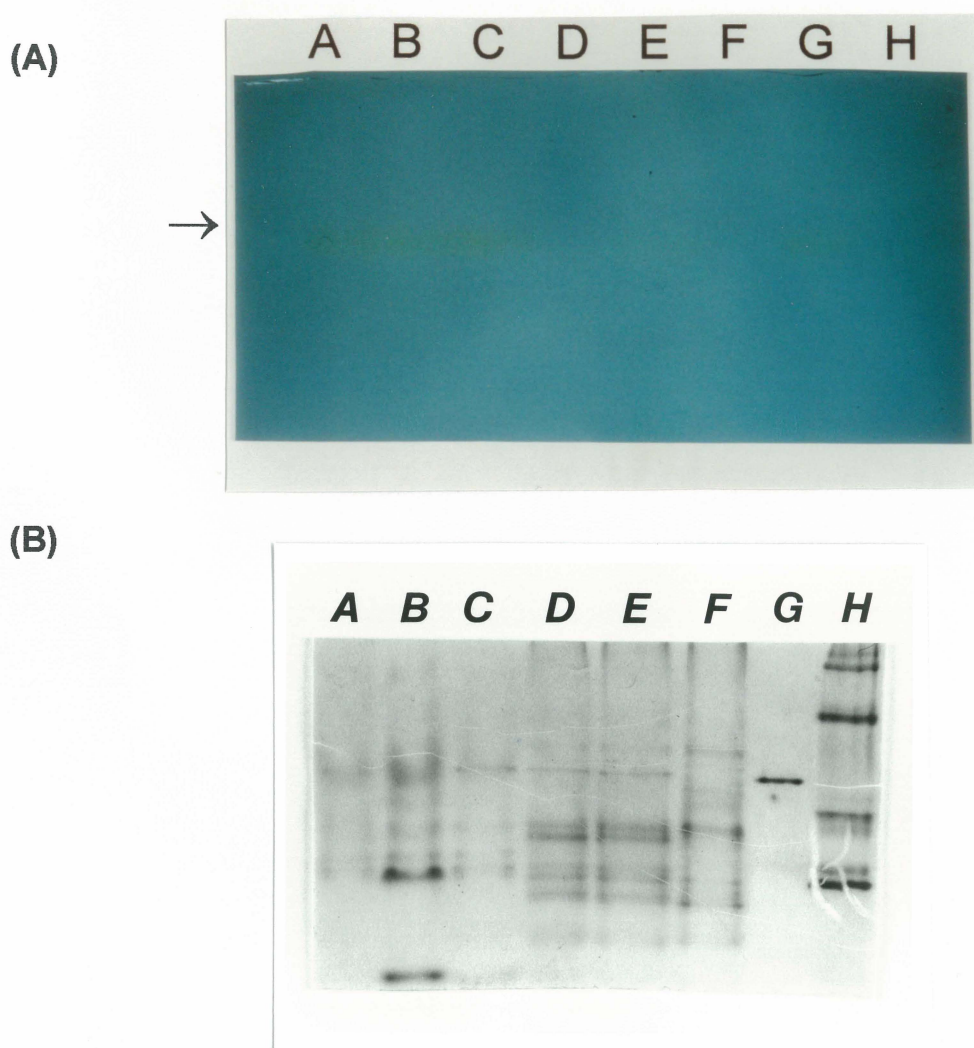
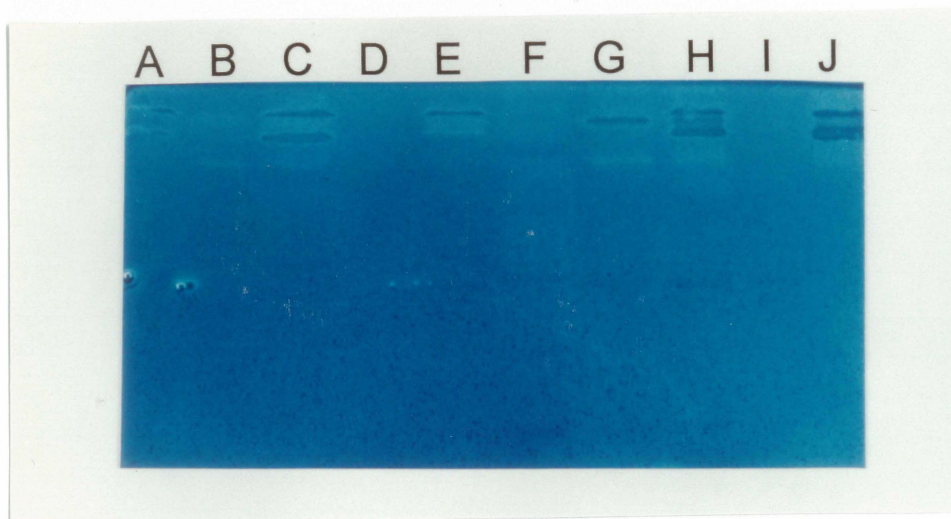


Figure 31 : Zymogramme (A) et coloration au bleu de Coomassie (B) d'un gel de polyacrylamide non dénaturant et non réducteur pour les galactosidases. En (A): puits A et B, fraction intracellulaire de Gal1c et Gal1b; puits C, galactosidase purifiée de *B. stearothermophilus*; puits D, fraction intracellulaire de pUC18; puits E, F et G, fraction périplasmique de Gal1c, pUC18 et Gal1b et puits H, protéines de référence. En (B): puits A, B et C, fraction périplasmique de Gal1c, pUC18 et Gal1b; puits D, E et F, fraction intracellulaire de Gal1c, Gal1b et pUC18; puits G: galactosidase purifiée de *B. stearothermophilus* et puits H: protéines de référence (kDa): thyroglobuline (669), ferritine (440), catalase (232), lactate déshydrogénase (140) et albumine bovine (67).

(A)



(B)

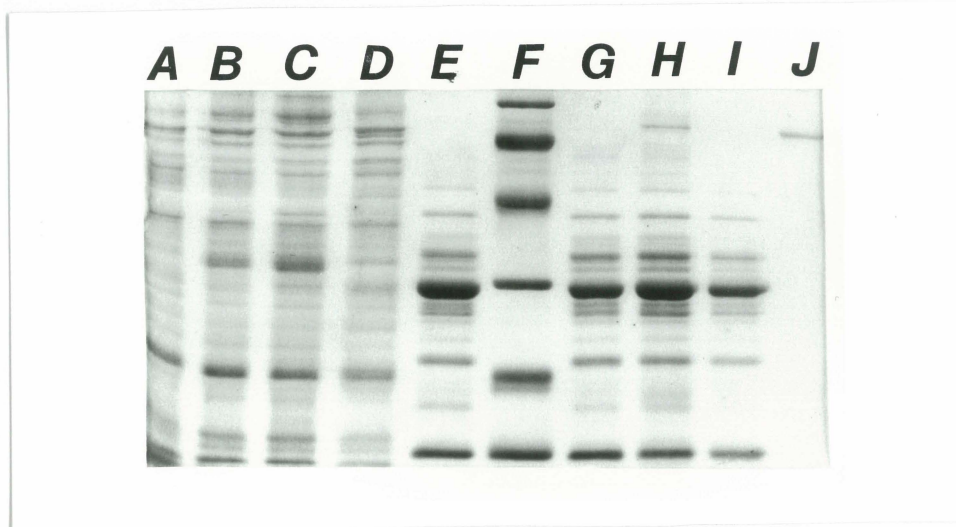
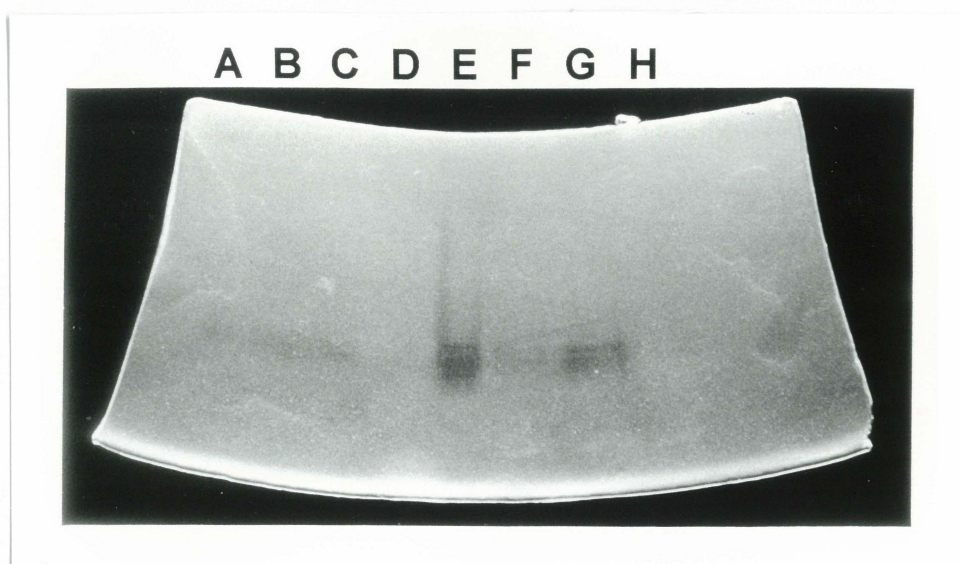


Figure 32 : Zymogramme (A) et coloration au bleu de Coomassie (B) d'un gel de SDS-polyacrylamide pour les mannanases. En (A) ou en (B): puits A, B, C et D, fraction intracellulaire de Man1, Man4, Man7 et pUC18; puits E, fraction périsplasmique de Man1; puits F, protéines de référence (kDa): phosphorylase *b* (97.4), albumine bovine (66.2), ovalbumine (45), anhydrase carbonique (31.0), inhibiteur de trypsine (21.5) et lysozyme (14.4); puits G, H et I, fraction périsplasmique de Man4, Man7 et pUC18 et puits J, mannanase purifiée de *B. stearothermophilus*.

(A)



(B)

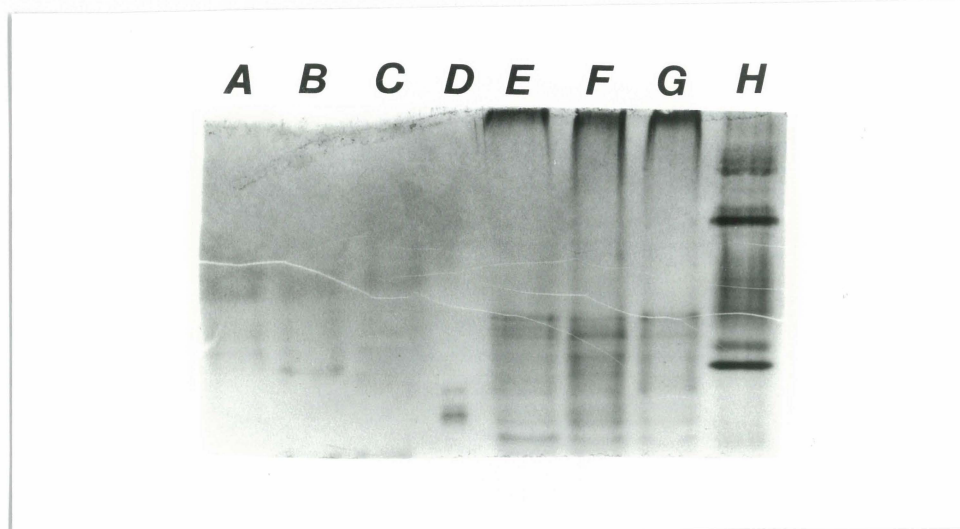


Figure 33 : Zymogramme (A) et coloration au bleu de Coomassie (B) d'un gel de polyacrylamide non dénaturant et non réducteur pour les xylanases. En (A): puits A, protéines de référence; puits B, C et D, fraction périplasmique de XylA, XylC et pUC18; puits E, xylanase purifiée de *B. stearothermophilus*, puits F, G et H, fraction intracellulaire de XylA, XylC et pUC18. En (B), puits A, B et C, fraction périplasmique de XylA, pUC18 et XylC; puits D, xylanase purifiée de *B. stearothermophilus*; puits E, F et G, fraction intracellulaire de XylA, XylC et pUC18 et puits H, protéines de référence (V. figure 31).

(A)



(B)

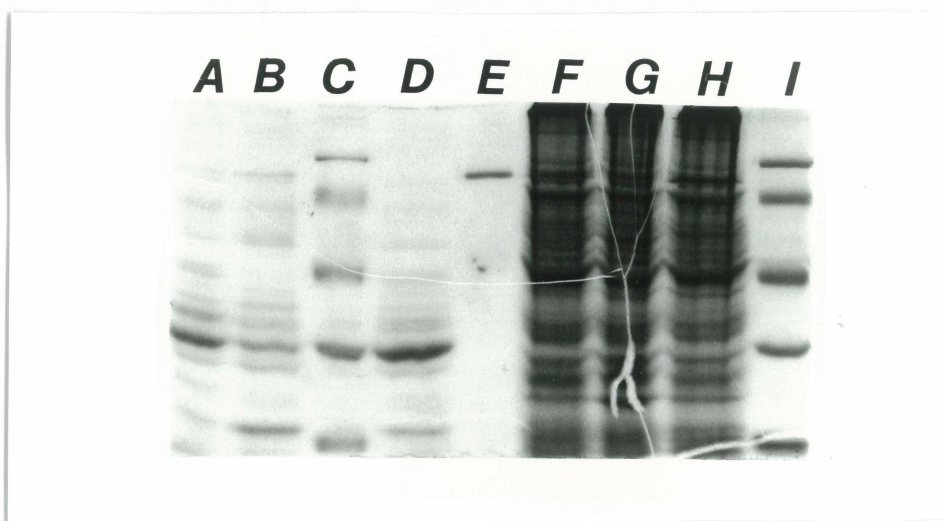


Figure 34 : Zymogramme (A) et coloration au bleu de Coomassie (B) d'un gel de SDS-polyacrylamide pour les xylosidases. En (A): puits A, B et C, fraction périplasmique de Xylo1, Xylo3 et pUC18; puits D, xylosidase purifiée de *B. stearothermophilus*; puits E, F et G, fraction intracellulaire de Xylo1, pUC18 et Xylo3 et puits H, protéines de référence. En (B): puits A, B et D, fraction intracellulaire de Xylo1, Xylo3 et pUC18; puits C et I, protéines de référence (kDa): phosphorylase *b* (97.4), albumine bovine (66.2), ovalbumine (45), anhydrase carbonique (31.0) et inhibiteur de trypsine (21.5); puits E, xylosidase purifiée de *B. stearothermophilus* et puits F, G et H, fraction intracellulaire de Xylo1, pUC18 et Xylo3.

3.6. Région N-terminale des mannanase et galactosidase

3.6.1. Séquence d'acides aminés et sondes d'ADN déduites

Les séquences N-terminales d'acides aminés des mannanases B et C ainsi que de la galactosidase qui ont été déterminées par le docteur Lazure (Institut de Recherches Cliniques de Montréal) sont représentées à la figure 35. La séquence du fragment obtenu après digestion à la protéinase K pourrait être adjacente à la séquence N-terminale comme montré par les acides aminés soulignés. Ces analyses ont été difficiles à réaliser car les rendements de récupération des protéines de la membrane PVDF étaient faibles (de l'ordre de 10%). Il n'a pas été possible d'obtenir de séquences N-terminales pour la xylanase et la xylosidase; qu'elles aient ou non été digérées par la protéinase K ou par la trypsine (afin d'éventuellement générer de nouveaux N-terminaux qui pourraient être séquencés).

Galactosidase : P I Q V N E E D K (D ou E) F (F) L F N (R N T D)

Mannanase B ou C : K T K (G) E P A T P T K D N E F

Mannanase C* : (X) (D ou E) N (E) F V Y S K G D K L M I G N K E F (R)

*; Fragment obtenu après digestion par la protéinase K.

Figure 35 : Séquences d'acides aminés des galactosidase et mannanase. Les acides aminés soulignés pourraient être les mêmes dans la séquence protéique. Les résidus entre parenthèses sont incertains.

Les séquences d'acides nucléiques déduites des séquences d'acides aminés ont été utilisées comme amorce dans un séquençage utilisant la Taq polymérase afin de valider l'identité des clones mannanase et galactosidase obtenus. La séquence de ces oligonucléotides dégénérés a été réalisée selon la fréquence d'utilisation des codons chez les bacilles (McConnel et al., 1986). Ces amorces sont montrées à la figure 36.

Galactosidase :

^{5'} CCI	ATT	CAI	GTI	AAT	GAA	GAA	GAT	AAA	GAI	TTT ^{3'}
P	I	Q	V	N	E	E	D	K	(D ou E)	F

Mannanase :

^{5'} GAI	CCI	GCI	ACI	CCI	ACI	AAA	GAT	AAT	GAA	TTT ^{3'}
E	P	A	T	P	T	K	D	N	E	F

Figure 36 : Oligonucléotides déduits des séquences protéiques de la galactosidase et de la mannanase.

3.6.2. Séquençage des clones mannanase et galactosidase

L'identité des clones galactosidase Gal1a et mannanase Man1, Man4 et Man7 a été vérifiée en séquençant à haute température (70°C) avec la Taq polymérase tel que décrit au point 2.10.3. La figure 37 illustre l'analyse sur gel de polyacrylamide-urée de la réaction de séquençage, faite avec des didésoxythymidine triphosphates seulement (ddTTP). Des bandes d'ADN obtenues pour les clones Man1, Man4 et Man7 montrent que ces derniers contiennent tous la séquence N-terminale de la mannanase originale purifiée de

la bactérie *B. stearothermophilus*. La séquence est identique pour les trois clones mannanase Man1, Man4 et Man7. Aucune bande d'ADN n'a été observée pour le clone galactosidase.



Figure 37 : Gel de polyacrylamide-urée de séquençage par PCR des clones Gal1a, Man1, Man4 et Man7. Puits A, Gal1a; puits B, Man1; puits C, Man4 et puits D, Man7.

3.7. Séquence du gène de la chitosanase

Le clone pBR172 a été obtenu dans notre laboratoire lors des études doctorales de Dre Anne Pelletier (Pelletier, 1991) en criblant une bibliothèque d'ADN génomique de *Bacillus megaterium* sp. avec une sonde déduite de la séquence N-terminale de la chitosanase purifiée (Pelletier et Sygusch, 1989). Le séquençage, déjà réalisé en partie par Maude Simoneau de notre laboratoire, a été vérifié et finalisé en sous-clonant dans le phage M13 et en utilisant la panoplie d'amorces (oligonucléotides) synthétisées préalablement. L'alignement des séquences a été effectué par le Dr Dean Tolan de Boston University. L'analyse de l'homologie de cette séquence avec d'autres séquences est discutée au prochain chapitre (point 4.6.).

"-10"

TG TAG TA AGC AT TTT TAA AAG GAG AG CTG ACA AC ATA							ATG	AAT	GGA	AAA	AGA	AAA	ATT	TTC	ACA	TGT	
SLR							M	N	G	K	R	K	I	F	T	C	
35-14-6							-49							-40			
ATT I	TCT S	ATT I	GTA V	GGA G	ATC I	GGA G	CTA L	GCT A	AGT S -30	TTT F	TCT S	AAT N	TCT S	AGT S	TTC F	GCA A	
GCA A	AGT S	GTA V -20	ACG T	GAC D	AAT N	TCA S	GTA V	CAA Q	AAT N	TCT S	ATT I	CCC P -10	GTA V	GTT V	AAT N	CAA Q	
CAA Q	GTA V	GCT A	GCT A	GCA A	AAG K 1	GAA E	ATG M	AAA K	CCA P	TTT F	CCG P	CAG Q	CAA Q	GTT V 10	AAT N	TAT Y	
GCA A	GGT G	GTT V	ATA I	AAA K	CCG P	AAT N	CAT H 20	GTT V	ACA T	CAG Q	GAA E	AGT S	TTA L	AAT N	GCT A	TCT S	
GTA V 30	AGA R	AGT S	TAC Y	TAC Y	GAT D	AAT N	TGG W	AAA K	AAG K	AAA K 40	TAT Y	TTG L	AAA K	AAT N	GAT D	TTA L	
TCT S	TCT S	TTA L	CCT P 50	GGT G	GGT G	TAT Y	TAC Y	GTA V	AAA K	GGA G	GAG E	ATT I	ACA T 60	GGT G	GAT D	GCA A	
GAT D	GGG G	TTT F	AAG K	CCA P	CTT L	GGA G 70	ACT T	TCA S	GAA E	GGT G	CAA Q	GGG G	TAT Y	GGG G	ATG M	ATA I 80	
ATT I	ACA T	GTA V	TTA L	ATG M	GCT A	GGT G	TAT Y	GAT D	TCG S 90	AAT N	GCT A	CAA Q	AAA K	ATC I	TAT Y	GAC D	
GGT G	TTA L	TTT F 100	AAA K	ACA T	GCA A	AGA R	ACT T	TTT F	AAA K	AGT S	TCT S	CAA Q	AAT N	CCT P	AAT N	TTA L	
474-495-6																	
ATG M	GGA G	TGG W	GTT V	GTC V	GCA A 120	GAT D	AGT S	AAA K	AAA K	GCA A	CAA Q	GGT G	CAT H	TTT F	GAT D 130	TCT S	
GCT A	ACT T	GAT D	GGA G	GAT D	TTA L	GAT D	ATT I	GCG A 140	TAT Y	TCT S	CTT L	CTT L	CTT L	GCT A	CAT H	AAG K	

CAG Q	TGG W 150	GGA G	TCT S	AAT N	GGA G	ACA T	GTT V	AAT N	TAT Y	TTG L	AAA K 160	GAA E	GCA A	CAA Q	GAC D	ATG M
ATT I	ACA T	AAA K	GGT G	ATT I 170	AAA K	GCT A	AGT S	AAT N	GTT V	ACA T	AAT N	AAT N	AAC N	CGA R 180	CTA L	AAT N
TTA L	GGA G	GAT D	TGG W	GAT D	TCT S	AAA K	AGT S 190	TCA S	CTT L	GAT D	ACG T	AGA R	CCA P	TCT S	GAT D	TGG W
ATG M 200	ATG M	TCA S	CAC H	CTT L	AGA R	GCA A	TTT F	TAT Y	GAA E	TTT F 210	ACA T	GGT G	GAT D	AAA K	ACT T	TGG W
CTT L	ACT T	GTT V	ATT I 220	AAT N	AAT N	TTG L	TAC Y	GAT D	GTT V	TAT Y	ACG T	CAA Q	TTT F 230	AGT S	AAT N	ACA T
TAC Y	TCT S	CCA P	AAT N	ACA T	GGA G	CTT L 240	ATT I	TCA S	GAT D	TTC F	GTT V	GTA V	AAA K	AAC N	CCA P	CCA P 250
CAA Q	CCC P	GCA A	CCT P	AAA K	GAC D	TTC F	TTA L	GAT D	GAG E 260	TCA S	GAA E	TAT Y	ACA T	AAT N	GCA A	TAT Y
TAT Y	TAC Y	AAT N 270	GCT A	AGT S	CGG R	GTA V	CCA P	TTG L	AGA R	ATT I	GTA V	ATG M 280	GAC D	TAT Y	GCG A	ATG M
TAC Y	GGC G	GAG E	AAA K	AGA R	AGT S 290	AAA K	GTC V	ATT I	TCT S	GAT D	AAA K	GTT V	TCT S	TCG S	TGG W 300	ATT I
CAA Q	AAT N	AAA K	ACG T	AAT N	GGA G	AAT N	CCT P	TCT S 310	AAA K	ATT I	GTG V	GAT D	GGT G	TAT Y	CAA Q	TTA L
AAT N	GGA G 320	TC														

Figure 38 : Séquence de nucléotides et d'acides aminés du clone pBR172. Les régions potentiellement promotrices "-35" et "-10" ainsi que le site de liaison du ribosome (SLR) sont en caractères gras. Les sondes utilisées pour valider la région 5' sont soulignées. Le résidu d'acide aminé numéroté 1 est le résidu N-terminal de la chitosanase purifiée de *B. megaterium* (Pelletier, 1991).

3.8. Produit de PCR de la région 5' du gène de la chitosanase

La région 5' du clone pBR172 (Pelletier, 1991) n'étant pas homologue à la séquence de la cellulase Endo-K (Ozaki et al., 1991), une amplification *in vitro* (PCR) de cette région, à partir de l'ADN génomique de *B. megaterium*, a été effectuée tel que décrit au point 2.11.3. Les amorces utilisées, appelées 35-14-6 et 474-495-6, sont montrées à la figure 37. On peut ainsi vérifier que cette région n'est pas le résultat d'un artefact de clonage qui peut, par exemple, se produire lors de la ligation des fragments d'ADN avec le vecteur. La réaction de PCR en utilisant le plasmide pBR172 est utilisé comme témoin positif et comme taille d'ADN de référence. Le produit de PCR obtenu avec l'ADN génomique a la même taille, 530 pb, que lorsque le plasmide pBR172 est utilisé. On peut donc conclure que la partie 5' du gène fait véritablement partie de la région codante du polypeptide puisque la région 5' du gène se retrouve aussi au niveau de l'ADN génomique. La figure 39 montre les produits de PCR obtenus.

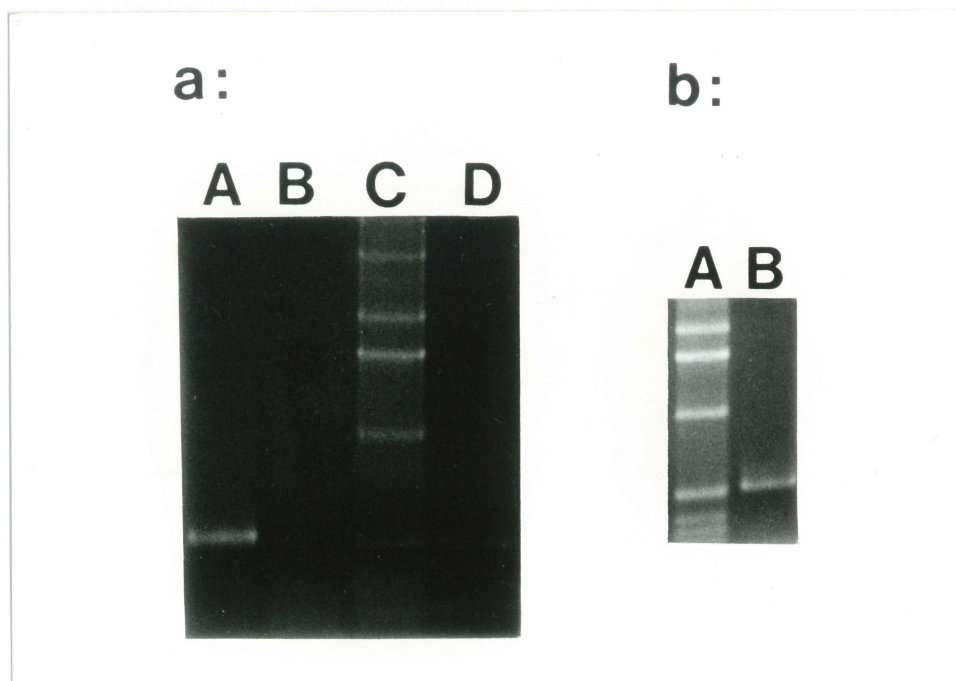


Figure 39 : Amplification *in vitro* d'une région 5' du gène de la chitosanase. L'ADN utilisé comme matrice dans les réactions de PCR sont: En a: puits A, 20 pg de pBR172; puits B, 2 pg de pBR172; puits D, 0.2 pg de pBR172; en b: puits B, 1 µg d'ADN génomique de *B. megaterium*. Le marqueur de masse moléculaire utilisé (au puits C en a: et au puits A en b:) est le "1 kb ladder": 3.054 (en a: seulement), 2.036, 1.636, 1.018, 0.517, 0.396 et 0.344 kb.

4. DISCUSSION

4.1. Production des hémicellulases

Le fait d'avoir retrouvé des α -galactosidase, β -mannanase, β -xylanase et β -xylosidase en incubant *B. stearothermophilus* avec les substrats polymériques correspondants démontre que cette bactérie thermophile est une bonne source d'hémicellulases. Le choix de la bactérie a donc été judicieux et de plus, ces enzymes devraient être thermostables puisque la bactérie est thermophile (Grüeninger et al., 1984).

La production des hémicellulases dans un milieu de culture où les bactéries sont en phase stationnaire n'est pas un cas isolé puisque d'autres travaux indiquent que des enzymes sont sécrétées dans des conditions similaires (Pelletier et al., 1989; Kristjansson, 1992). Priest (1987) mentionne même que plusieurs enzymes extracellulaires de bacilles ne sont pas exprimées durant la phase exponentielle mais plutôt quand la culture de bactéries entre en phase stationnaire. Cependant, nous ne pouvons affirmer que ces enzymes soient toutes sécrétées puisque nous avons observé que des bactéries étaient lysées. En effet, une enzyme intracellulaire, l'aldolase, qui n'est normalement pas sécrétée dans le milieu de culture, a été retrouvée dans le milieu extracellulaire avec une augmentation de cette activité durant les trois premiers jours et une tendance à plafonner pour les jours suivants (figure 1). Ce profil d'activité aldolase n'est cependant pas le même que celui de la sécrétion de la

galactosidase. Il est possible que la lyse observée soit le résultat de la mort cellulaire (Pelmont, 1993). Il a d'ailleurs été proposé par Pelmont que la lyse de certaines cellules dans une population bactérienne dense - comme c'est le cas ici pour la production des hémicellulases - permette aux autres bactéries de survivre (Pelmont, 1993). Puisque la production des hémicellulases ne se fait qu'en milieu minimal contenant le substrat de l'hémicellulase, les enzymes sécrétées ou provenant de la lyse cellulaire dégraderaient la LBG afin d'avoir une source de carbone utilisable par les cellules intactes.

Il est intéressant de noter que l'activité de la galactosidase est à son maximum dans le milieu extracellulaire après 5 jours d'incubation des bactéries dans le milieu minimal (supplémenté de galactomannane) et que le maximum d'activité de la mannanase est détecté après 2 jours. Ces résultats suggèrent que le polymère serait d'abord dépolymérisé en oligosaccharides par la mannanase avant que la production de galactosidase ne soit stimulée. La spécificité de la galactosidase dont nous allons parler plus loin appuie cette interprétation puisque cette enzyme n'a pas d'activité envers la LBG entière qui est utilisée comme source de carbone dans le milieu minimal. Gherardini et Salyers (1987) ont d'ailleurs rapporté que la biodégradation de la gomme de guar se ferait d'abord par un clivage enzymatique du squelette de résidus mannose puis l'enlèvement des résidus galactoses - effectué par les galactosidases - nécessiterait des fragments d'oligogalactomannanes.

Le niveau maximal d'activité mannanase produite de 0.9 U/ml est

comparable à celui obtenu pour les mannanases produites par la bactérie *B. subtilis* (0.5 U/ml) (McCleary, 1988) et par le champignon *Trichoderma harzianum* E58 (0.6 U/ml) (Torrie et Saddler, 1990). Ce niveau de production est aussi semblable à celui rapporté dans le cas de plusieurs autres bacilles (Araujo et Ward, 1990). Le niveau d'expression est de 0.7 U/ml pour *B. megaterium* ATCC 4513 et de 4.1 U/ml pour *B. polymyxa* NRRL 842. Cependant plusieurs autres souches de *B. subtilis* sont de meilleures productrices de cette protéine car le niveau de production varie de 7.6 U/ml à 106.2 U/ml (Araujo et Ward, 1990).

L'activité galactosidase, elle, est présente à un taux maximal de 0.07 U/ml après 5 jours d'induction. Comme mentionné plus haut, la galactosidase serait induite et sécrétée dans le milieu extracellulaire. Cependant les travaux de Pederson et Goodman (1980) portant sur la purification et la caractérisation des galactosidases I et II de *B. stearothermophilus* souche AT-7 montrent que ces enzymes sont exprimées constitutivement (elles ne sont pas induites par la présence de substrats dans le milieu de culture) et se retrouvent dans le milieu intracellulaire. Des essais d'induction en présence de galactomannane n'ont par contre pas été effectués. L'équipe de Civas (1984a, 1984b) a testé l'induction de trois galactosidases inductibles (I, II et III) d'*Aspergillus tamarii* en utilisant soit des galactosides, ou soit la LBG comme source de carbone. Les résultats ont indiqué que seule la galactosidase III était induite à un niveau relativement élevé en présence de la galactomannane (Civas et al., 1984b). Les travaux de l'équipe de Salyers (Gherardini et al., 1985) portant sur des études d'induction de deux

isoenzymes ayant une activité galactosidase ont eux aussi décrit que différentes galactosidases sont induites par la gomme de guar au lieu de galactosides. Donc, il est possible que notre souche de *B. stearothermophilus* qui n'a pas de galactosidase constitutive possède par contre une galactosidase intracellulaire qui est inductible, mais cette fois, par la présence de galactosides.

4.2. Purification des hémicellulases

Les quatre hémicellulases purifiées et décrites ici n'ont pas une activité spécifique exceptionnellement élevée. Les rendements sont faibles, la purification ayant nécessité l'utilisation de plusieurs colonnes chromatographiques. Les facteurs de purification sont cependant importants, surtout pour la galactosidase. La purification de la galactosidase après six jours d'induction apporte les deux améliorations suivantes. Premièrement, l'activité spécifique de l'extrait brut est plus élevée. C'est donc en principe un extrait qui sera plus facile à purifier. Deuxièmement, la quantité de protéines purifiées est augmentée de deux fois. Mais pour des raisons pratiques, la galactosidase utilisée pour les caractérisations subséquentes a été purifiée en même temps que la mannanase, soit après quarante-huit heures d'induction. L'utilisation de nouvelles matrices échangeuses d'ions préparatives Q Sépharose "Fast Flow" et S Sépharose "Fast Flow" (Pharmacia) reliées au système F.P.L.C. a permis d'éliminer l'étape première de filtration sur gel (Séphacryl S-200) qui était une longue étape de purification. Cette étape de filtration sur gel a été éliminée autant pour la purification de la

galactosidase que pour celle de la mannanase.

La mannanase et la galactosidase sont éluées tardivement en chromatographie à interactions hydrophobes, comme le montrent les profils d'élution avec la Phényl-Superoxe (figures 2D, 3B, 4C et 5C). De plus, la concentration de sulfate d'ammonium initiale ne doit pas être trop élevée sinon le rendement obtenu après élution par le gradient est plus faible. Ce comportement suggère que ces protéines ont une grande affinité pour cette matrice hydrophobe. Ce degré d'hydrophobicité causé par des résidus d'acides aminés hydrophobes exposés au solvant pourrait, pour ces protéines, être un facteur stabilisateur. En effet, malgré la généralité stipulant que des substitutions de résidus d'acides aminés exposés au solvant n'affectent pas beaucoup la stabilité d'une protéine (Bowie et al., 1990; Rennell et al., 1991), des travaux récents de l'équipe de Eijsink (Van Den Burg et al., 1994) montrent qu'une protéase neutre de *B. stearothermophilus* dont un seul résidu localisé à la surface est substitué pour un résidu plus hydrophobe voit sa thermostabilité augmentée de 6.2 °C. Cette amélioration de la thermostabilité est importante. Dans ce cas, le résidu hydrophobe permet de conserver la forme native de la protéase en empêchant le dépliement de la protéine par une solvatation. L'observation de cette affinité pour la matrice hydrophobe est donc à considérer dans de futurs projets d'étude de la thermostabilité des hémicellulases recombinantes décrites ici par mutagénèse dirigée.

La mannanase lorsqu'élue de la colonne à interactions hydrophobes

(Phényl-Sepharose) se retrouve répartie en trois pics A, B et C (figures 4C et 5C). L'activité des mannanases A et C représente respectivement environ 5 et 20 % de l'activité mannanase totale. En filtration sur gel (Superose 12, figure 5) les mannanases B et C sont éluées à un volume semblable. La mannanase A se comporte différemment. Elle est éluée à un volume plus grand laissant supposer une masse moléculaire plus petite. La mannanase A, lorsqu'analysée sur gel SDS-PAGE, montre deux bandes majeures dont l'intensité relative varie selon les expériences. Une bande a la même masse moléculaire que les mannanases B et C et l'autre bande a une masse moléculaire inférieure. Cette dernière bande protéique peut être un contaminant, un produit de dégradation protéolytique ou être une protéine ayant une interaction forte et potentiellement fonctionnelle avec la mannanase A. La mannanase A n'a pas été caractérisée davantage. Etant donné que l'activité spécifique des mannanases B et C est très semblable, il est possible qu'une micro-hétérogénéité conformationnelle n'affectant pas ou peu l'activité de la protéine (résultant en une variation de l'hydrophobicité en surface) ait été détectée par chromatographie à interactions hydrophobes. De même, l'aldolase de *E. coli* purifiée par ce type de matrice a montré un comportement semblable dans notre laboratoire (Coulombe, 1992).

Les xylanase et xylosidase ont été purifiées en vue d'obtenir une quantité suffisante de protéines afin de les micro-séquencer. Malgré des étapes de purification différentes, les deux enzymes ont la même masse moléculaire (d'après leur migration sur gel d'électrophorèse de SDS-PAGE) que celui déjà

décrit (Azzi, 1991) et sont suffisamment homogènes pour être séquencées. Les activités spécifiques sont cependant légèrement supérieures (250U/mg au lieu de 181U/mg pour la xylanase et 30 U/mg au lieu de 22.9 U/mg pour la xylosidase) à celles rapportées pour un facteur de purification très semblable (Azzi, 1991). Cette amélioration de l'activité spécifique peut être attribuée à un temps de purification réduit. Aucune des bandes transférées sur membrane PVDF puis excisées n'ont donné un rendement assez élevé pour obtenir une séquence. Ces faibles rendements peuvent être le résultat d'une modification du résidu en position N-terminale durant l'électrophorèse et le transfert ou être le résultat d'une élution à trop faible rendement de la protéine transférée sur la membrane PVDF lors de l'étape première de séquençage. Cette dernière hypothèse est probable puisque ces protéines sont hydrophobes si on se réfère à leur comportement sur colonne à interactions hydrophobes.

Afin de comparer l'identité des clones des xylosidase et xylanase avec les protéines purifiées biochimiquement ici, un séquençage à partir de fragments de ces dernières obtenus par l'action de protéases est à envisager. Des essais préliminaires de digestion avec la trypsine et la protéinase K, pour la xylosidase, ont donné une protéolyse limitée où le seul fragment protéique n'a pu être microséquencé pour les mêmes raisons ci-haut énumérées.

4.3. Caractérisation de la galactosidase et de la mannanase

Les galactosidase et mannanase purifiées biochimiquement puis caractérisées ont fait l'objet d'une publication de la part de notre équipe (Talbot et Sygusch, 1990). La caractérisation de la xylanase et de la xylosidase est détaillée dans le mémoire d'Arezki Azzi (Azzi, 1991).

4.3.1. Masse moléculaire, pI et pH optimal

La galactosidase purifiée dans notre laboratoire possède une masse moléculaire apparente en gel d'électrophorèse de polyacrylamide dénaturant et réducteur (SDS-PAGE) de 82 ± 5 kilodaltons, ce qui est semblable à celui des isoenzymes intracellulaires I et II de *B. stearothermophilus* souche AT-7 (81 ± 0.5 kDa et 84 ± 0.5 kDa respectivement; Pederson et Goodman, 1980), des isoenzymes intracellulaires I et II de *Aspergillus tamarii* (88 kDa et 77.5 kDa, respectivement). Ces galactosidases possèdent une masse moléculaire élevée, celles isolées de graines de plante ont des masses moléculaires deux fois et même quatre fois moins élevées (Tableau XII). La sécrétion ne semble pas liée à la masse moléculaire des galactosidases; par exemple, celle sécrétée par *Saccharomyces carlsbergensis* possède une masse moléculaire de 90 kDa comparativement à celle sécrétée par *Trichoderma reesei* qui a une masse moléculaire de 50 kDa (Tableau XII).

La masse moléculaire de la mannanase purifiée dans notre laboratoire est la plus élevée. La mannanase de *B. subtilis* TX1 a une masse moléculaire de 37

kDa comparativement à celle des mannanases B et C qui est de 73 kDa (Tableau XIII).

Le point isoélectrique de la galactosidase et des mannanases B et C a été estimé à partir du gel d'isoélectrofocalisation de la figure 12. La migration de ces protéines a résulté en plusieurs bandes suggérant que les préparations de protéines purifiées ont subi des modifications affectant la charge nette. Cette microhétérogénéité peut résulter de la modification de certains résidus d'acides aminés (méthylation, acétylation, phosphorylation et désamidation pouvant se produire durant la purification), de la présence de plusieurs conformères stables ou encore d'interactions avec les ampholytes (Gianazza et Righetti, 1980).

La mannanase B possède une activité optimale à des pH allant de 5.5 à 7.5. Ce profil est semblable à celui des mannanases d'autres bacilles (Araujo et Ward, 1990; Tableau XIII). Cependant c'est la seule qui conserve environ 50% de l'activité maximale à pH 8.5, les autres en conservent moins de 20%. La galactosidase possède un pH optimal de 7 à 7.5 en conservant 65% d'activité à un pH de 8.5. La seule autre galactosidase ayant un pH optimal neutre ou basique est l'isoenzyme II de *B. stearothermophilus* AT-7 (Pederson et Goodman, 1980; Tableau XII). Pederson et Goodman (1980) ne montrent pas le profil de pH en fonction de l'activité et ne mentionnent pas non plus l'activité résiduelle dans des conditions basiques. Il est intéressant de constater que les galactosidase et mannanase purifiées dans notre laboratoire sont actives à pH basique puisque c'est une caractéristique économiquement importante en vue de

leur utilisation dans le procédé de fabrication du papier. En effet, rappelons ici que le procédé de fabrication du papier Kraft requérant des conditions alcalines (Paice et Jurasek, 1984), la possibilité de prétraiter la pâte avec des hémicellulases alcalophiles est un avantage. L'utilisation de telles enzymes nécessitera une quantité réduite d'acide pour ajuster le pH de la solution de pulpe de bois aux conditions de traitement enzymatique.

Tableau XII. Caractéristiques des galactosidases

Microorganisme ou plante	P.M. ^a (kDa)	Sécré- tion	pI	pH _{opt}	Paramètres cinétiques			Référence
					K _m (mM)	V _{max} (U/mg)	V _{max} / K _m	
<i>B.stearothermo- philus</i> NCA 2106	82 (247)	oui	5.4-5.9	7-7.5	0.25	195	780	Talbot et Sygusch, 1990
Graine de guar	40.5	-	3.7	4.5-5	-	52.1 ^b	-	McCleary, 1988
Graine de luzerne	21	-	4.6	4.5- 5.5	-	81.5 ^b	-	McCleary, 1988
Graine de trèfle	41	-	-	5.5	8	277	35	Williams et al., 1978
<i>S. carlsbergensis</i>	90 (300)	oui	-	4-5	6	125	21	Lazo et al., 1978
<i>T. reesei</i>	50 (50)	oui	5.2	4	1.2	30.1	25	Zeilinger et al., 1993
<i>B. stearrowthermo- philus</i> AT-7	I 81 (280)	non	-	6	0.47	290 ^b	617	Pederson et Goodman, 1980
	II 84 (325)	non	-	7	0.53	217 ^b	410	
<i>A. tamarii</i>	I 88 (265)	non	-	4.2- 4.3	2.3	2272.7	990	Civas et al., 1984a
	II 77.5 (254)	non	-	4.2- 4.3	3.8	1818.2	480	
<i>A. tamarii</i>	56 (56)	oui	-	4.8	1.3	505	390	Civas et al., 1984b
<i>B. ovatus</i>	I 85 (250)	non	5.6	5.9- 6.4	0.2	129 ^b	645	Gherardini et al., 1985
	II 80.5 (250)	non	6.9	6.3- 6.5	0.4	41 ^b	102	

a : P.M. = masse moléculaire; valeur entre parenthèse = P.M. sous conditions natives

b : activité spécifique obtenue après purification (V_{max} non rapporté)

Table XIII. Caractéristiques des mannanases.

Microorganisme	P.M. ^a (kDa)	Sécré- tion	pI	pH _{opt}	Paramètres cinétiques			Référence
					K _m (mg/ml)	V _{max} (U/mg)	V _{max} / K _m	
<i>B.stearothermo- philus</i> NCA 2106	73 (162)	oui	5.9-6.5	5.5-7.5	1.5	455	300	Talbot et Sygusch, 1990
<i>Basidiomycetes</i> sp.	53	non	5-5.5	3.0	0.3	60	200	McCleary, 1979
<i>S. lividans</i> 66	36 (36)	oui	3.5	6.7	0.77	207	269	Arcand et al., 1993
<i>Trifolium repens</i> I	43	-	-	5.1-5.6	3.8	71.4	19	Villarroya et al., 1978
	38	-	-	5.1-5.6	12.3	117.6	9.6	
Graine de guar	41.7	-	5.3-6.1	4-5	0.3- 0.5	121 ^b	400	McCleary, 1988
Graine de luzerne	41	-	4.5	4.5	0.9	129.3 ^b	144	
<i>Helix pomatia</i>	37	-	7-7.4	4.5-5.5	0.3	-	-	McCleary, 1988
<i>Aspergillus niger</i>	45	non	4.0	3-8	0.1	39 ^b	390	McCleary, 1988
<i>Irpex lacteus</i>	53	non	5-5.5	3.0	0.3	59.1	197	Mc Cleary, 1988
<i>B. subtilis</i> TX1	37	oui	-	5-6	1.1	514 ^b	467	McCleary, 1988

a : P. M. = masse moléculaire; valeur entre parenthèse = P.M. sous conditions natives

b : activité spécifique obtenue après purification (V_{max} non rapporté)

4.3.2. Cinétique: V_{\max} et K_m

Des études cinétiques sur les galactosidase et mannanase purifiées à partir des cultures de *B. stearothermophilus* ont permis d'obtenir les paramètres cinétiques V_{\max} et K_m , calculés à partir de représentations graphiques de Lineweaver-Burke. Les résultats sont comparés avec ceux d'autres hémicellulases homologues.

La galactosidase purifiée dans notre laboratoire possède un K_m de 0.25 mM et un V_{\max} de 195 U/mg envers le PNPGal. Le K_m de la galactosidase inductible encodée par le plasmide Raf/H₂S dans *E. coli* K12 pour ce même substrat est du même ordre de grandeur, soit de 0.14 mM (Schmid et Schmitt, 1976). Les deux isoenzymes constitutives de *B. stearothermophilus* AT-7 ont des K_m de 0.59 mM et 0.23 mM qui sont eux aussi semblables à celui de la galactosidase caractérisée dans notre laboratoire. Cependant, les enzymes de *Streptococcus mutans* et de *E. coli* K12 (cette fois encodée au niveau du génome de la bactérie) ont respectivement un K_m de 4.4 mM et 3 mM (Burstein et Kepes, 1971; Aduse-Opoku et al., 1991); ce qui est environ dix fois plus élevé. Ces protéines n'ont pas été purifiées et n'ont donc pas été répertoriées dans le tableau XII. Les galactosidases d'*Aspergillus tamarai* ont été caractérisées avec le substrat o-nitro-phényl α -galactopyranoside (Civas et al., 1984a et 1984b; tableau XII); elles ne peuvent donc pas être comparées adéquatement. La galactosidase de *Trichoderma reesei* RUT C-30 a également été purifiée et caractérisée (Zeilinger et al., 1993; tableau XII). Contrairement aux autres

galactosidases mentionnées ci-haut, la vitesse maximale en plus du K_m de cette dernière ont été déterminés. La galactosidase de *T. reesei* RUT C-30 possède un K_m de 1.2 mM et un V_{max} de 30.1 U/mg envers le PNPGal. Cette enzyme est moins efficace que celle isolée de *B. stearothermophilus* puisque le ratio d'efficacité V_{max} / K_m est plus grand dans notre cas. Les galactosidases ayant une efficacité d'hydrolyse envers le PNPGal comparable à celle de notre galactosidase ont été purifiées de *B. stearothermophilus* souche AT-7 et de *Bacteroides ovatus* (Tableau XII).

La représentation de Lineweaver-Burke de la cinétique de l'hydrolyse de la LBG par la mannanase purifiée montre deux comportements de l'enzyme qui dépendent de la concentration en substrat. En effet, la vitesse initiale de l'enzyme a tendance à diminuer lorsque la concentration en substrat est plus grande que 5 mg/ml; ce qui suggère que le substrat inhibe l'activité (figure 14). Ce comportement a déjà été identifié pour d'autres glycohydrolases comme la xylanase de *Streptomyces roseiscleroticus* (Grabski et Jeffries, 1991), la xylanase de *B. stearothermophilus* (Azzi, 1991) et l'acétylxylanestérase de *Streptomyces olivochromogenes* (Johnson et al., 1988). Cette caractéristique est importante à définir afin d'établir les concentrations de substrats adéquates pour une hydrolyse optimale dans un procédé industriel. Le K_m obtenu à partir de la région linéaire d'ordre 1 correspondant à des concentrations de LBG plus petites est de 1.5 mg/ml et la vitesse maximale extrapolée est de 455 U/mg. Le ratio d'efficacité V_{max}/K_m est de 300 (Tableau XIII). Les mannanases purifiées rapportées au

tableau XIII ont un ratio d'efficacité du même ordre de grandeur, excepté pour les mannanases I et II de trèfle (*Trifolium repens*) qui ont un ratio de 19 et de 9.6 respectivement.

4.3.3. Thermostabilité

Il est à noter que nous avons procédé aux études de thermostabilité sur les galactosidase et mannanase purifiées et sans aucun additif. De cette façon, la thermostabilité obtenue est intrinsèque à la protéine. Il faudra donc considérer cet état pour des études comparatives avec d'autres enzymes homologues car la thermostabilité d'une protéine peut être améliorée en présence d'autres protéines (ajout de gélatine ou de BSA) ou de substrats (Schmid, 1979; Pederson et Goodman, 1980; Pelletier, 1991; Arcand et al., 1993).

La galactosidase et la mannanase purifiées dans notre laboratoire ont une thermostabilité des plus grandes parmi toutes les protéines de bactéries mésophiles ou thermophiles. Seules les protéines provenant de microorganismes thermophiles extrêmes et des archaebactéries ont une thermostabilité supérieure.

Les galactosidases I et II d'une autre souche de *B. stearothermophilus* (souche AT-7) ont une thermostabilité moindre que la galactosidase purifiée dans notre laboratoire. Les études de thermostabilité n'ont été effectuées qu'à une seule température (65°C) et pour une période de temps de 30 minutes seulement au lieu de 24 heures dans nos études. Après 30 minutes d'incubation à 65°C, la galactosidase I perd un peu moins de 30% d'activité et l'activité restante de la

galactosidase II est de seulement 10% (Pederson et Goodman, 1980). La galactosidase décrite dans ce travail ne perd que 30% d'activité après 24 heures de préincubation à cette même température (figure 16). Par contre, la galactosidase recombinante provenant d'une autre souche de *B. stearothermophilus* (souche KVE39 isolée de sources chaudes d'Islande et ayant une température optimale de croissance de 60-65°C) et clonée puis exprimée dans *E. coli* n'est inactivée qu'à 20% après 4 heures de préincubation de l'extrait cellulaire non purifié à 68°C (Ganter et al., 1988) tandis que la galactosidase étudiée dans notre laboratoire perd 70% de son activité après 90 minutes (figure 16). Il ne faut cependant pas oublier que l'extrait d'*E. coli* n'est pas complètement purifié et que la thermostabilité peut être alors surestimée.

Les études comparatives sur diverses mannanases de bacilles effectuées par Araujo et Ward (1990) montrent que ces protéines extracellulaires, non purifiées, ont une thermostabilité intéressante, surtout pour la mannanase de *B. licheniformis* où 70% de l'activité est conservée après 3 heures à 60°C. Cependant, la mannanase purifiée dans notre laboratoire est complètement stable à 65°C pendant une période de temps de 24 heures (figure 17). Une mannanase de la bactérie thermophile extrême *Caldocellum saccharolyticum* a été clonée et exprimée dans *E. coli* (Lüthi et al., 1991). Cette enzyme est complètement stable à 80°C durant une heure faisant d'elle une des hémicellulases les plus thermostables.

4.3.4. Spécificité et mode d'action

La galactosidase possède une grande spécificité pour le p -nitrophényl α -D-galactopyrannoside et dégrade de façon très limitée les polymères de galactomannanes (Tableau VII). Ce comportement est semblable à celui des galactosidases I et II du champignon *Aspergillus tamarii* qui sont des enzymes intracellulaires n'ayant aucune activité envers les galactomannanes (Civas et al., 1984). La galactosidase III de ce même champignon, elle, peut hydrolyser les galactomannanes dont le degré de polymérisation n'a pas été préalablement diminué (Civas et al., 1984). Cependant, l'efficacité d'hydrolyse n'est pas montrée quantitativement et laisse supposer que le taux de libération des résidus galactoses sur le polymère est également faible. Il est intéressant de noter que ces trois galactosidases sont toutes inductibles, les deux premières étant exprimées en présence de raffinose et la galactosidase III étant induite en présence de galactomannanes (LBG ou gomme de guar). Les galactosidases I et II sont présentes à un taux d'activité 100 fois inférieur lorsque l'induction se fait en présence de galactomannanes. Donc il est possible qu'un tel système enzymatique existe dans *B. stearothermophilus* mais nous n'avons purifié que la galactosidase induite par la LBG. Deux galactosidases sont induites également dans des conditions différentes chez *Bacteroides ovatus*, une bactérie anaérobie retrouvée dans le colon humain. La galactosidase I y est induite en présence de galactomannanes seulement (et non en présence de galactosides) tandis que la galactosidase II est induite par le galactose, le mélibiose, raffinose et stachyose

surtout; et elle l'est un peu en présence de gomme de guar (Gherardini et al., 1985).

La mannanase purifiée de notre souche bactérienne a une grande spécificité pour la LBG qui contient 18% de résidus branchés D-galactoses. La gomme de guar qui contient environ le double de ces résidus D-galactoses (38%) n'est pas aussi bien hydrolysée (à 15%, comparativement à la LBG, tableau VIII). Cette spécificité indique que l'enzyme n'hydrolyse pas (ou de manière moins efficace) en présence d'un substituant galactose. Ce comportement est typique de la plupart des mannanases (McCleary et Matheson, 1983; Gherardini et Salyers, 1987; Lüthi et al., 1991). Une mannane de *S. cerevisiae* contenant des résidus mannoses reliés entre eux par des liens glycosidiques α -1,2, α -1,3 et α -1,6 n'est pas hydrolysée par la mannanase. Les résidus liés par des liens β -1,4 doivent être des mannoses puisque la xylane et les différentes celluloses (cristallines ou modifiées pour être solubles) ne sont pas hydrolysées par la mannanase. Aucune activité β -mannosidase n'a été détectée dans la préparation purifiée de mannanase.

Le patron de digestion du LBG par la mannanase, présenté à la figure 15, est comparable à celui des mannanases de *A. niger*, *B. subtilis*, *H. pomatia* et *I. lacteus* (McCleary et Matheson, 1983). Ce sont des endo-mannanases. Les exo-mannanases, elles, hydrolysent des tri-mannoses (Araki et Kitamikado, 1982) et produisent des mannobioses (di-mannoses) à partir des extrémités non-réductrices des mannanes (analogie avec les exo-cellulases).

4.4. Clonage des hémicellulases

4.4.1. Efficacité du clonage

Les 10,000 et 22,000 différents clones des bibliothèques *EcoRI* et *HindIII* ont été suffisants afin d'isoler des clones positifs pour chacune des quatre enzymes recherchées. Ces bibliothèques semblent bien représenter chaque fragment d'ADN digéré par l'enzyme de restriction. La préparation de l'ADN était à haute masse moléculaire (figure 18) suggérant qu'elle était intacte et la ligation de ces fragments d'ADN digérés par *EcoRI* ou *HindIII* avec le vecteur de clonage pUC18 a été efficace. L'utilisation des bactéries *E. coli* DH5 α MCR supercompétentes (à efficacité de transformation supérieure à 10⁹ transformants/ μ g d'ADN) a permis d'obtenir un nombre de clones assez élevé pour accroître les chances de succès.

4.4.2. Avantage et désavantage de la méthode de criblage des bibliothèques d'ADN génomique

La méthode de criblage par détection de l'activité enzymatique s'est avérée fructueuse. Quatre types d'hémicellulases ont été clonées. L'avantage majeur de cette technique de criblage est que l'insert du clone positif encode un polypeptide possédant l'activité de l'hémicellulase recherchée. Ce qui pourrait ne pas être le cas si la détection du clone se faisait en hybridant avec une sonde d'acides nucléiques déduite d'une séquence en acides aminés qui est dégénérée.

Cependant, le clone sélectionné par la méthode de criblage par détection de l'activité enzymatique peut encoder un polypeptide correspondant à une hémicellulase tronquée en N- ou C-terminal. Une protéine tronquée en N-terminal serait exprimée sous le contrôle du promoteur lac du plasmide. Elle aurait 4 acides aminés N-terminaux de la sous-unité α de la β -galactosidase (produit du gène LacZ).

4.5. Caractérisation des clones

4.5.1. Taille des inserts d'ADN plasmidique

Les clones positifs ont un insert dont la taille varie de 2.7 à 19 kilobases (Tableau IX). Ces inserts ont une grande taille, ce qui était prévisible puisque le clone doit contenir un ADN assez long pour permettre l'expression d'un polypeptide ayant une activité hémicellulase et que les inserts avaient été sélectionnés pour une taille de 3 à 10 kb. Les inserts sont tous de longueur supérieure à la taille requise pour exprimer la totalité de la protéine désirée. Les séquences nucléotidiques en amont et en aval de la région codante pourraient contenir des éléments de régulation de l'expression. Il serait intéressant de vérifier le taux d'expression en présence de substrats ou de sucres.

Les clones ayant une activité mannanase ont été testés afin de vérifier s'il

n'y avait pas également une activité xylanase et vice-versa. Donc, malgré le fait que la taille de certains inserts aurait pu contenir deux région codantes pour des activités hémicellulases différentes, cela n'a pas été le cas. Les activités des galactosidase et xylosidase n'ont par contre pas été testées. Cependant, une équipe de chercheurs ayant publié de récents travaux sur le clonage d'une xylanase de *B. stearothermophilus* T-6 mentionne que le gène codant pour la xylosidase serait à 10,000 paires de base du gène de la xylanase (Gat et al., 1994). Mais cette xylanase n'a pas d'homologie avec celle clonée dans le travail décrit ici puisque le clone a été récemment séquencé par Nathalie Éthier, une étudiante de deuxième cycle dans le laboratoire du Dr Jurgen Sygusch.

4.5.2. Répartition de l'activité des hémicellulases

Les galactosidases recombinantes sont exprimées majoritairement au niveau du cytoplasme comme l'indique le tableau X. Le clone Gal1c, qui est le sous-clone de Gal1b tronqué de 2.3 kb, a la même distribution d'activité galactosidase que le clone Gal1b. Donc, l'enlèvement d'une partie de l'insert encodant une galactosidase n'a pas affecté la distribution de l'activité. Cependant, le taux d'expression est diminué environ de moitié comme le tableau XI l'indique. Il est donc suggéré que des éléments promoteurs ou modulateur de l'expression ont été enlevés ou bien que le polypeptide produit est tronqué et moins actif. Cependant, cette perte d'une portion N- ou C-terminale serait mineure puisque la migration sur gel de polyacrylamide en conditions non

dénaturantes et non réductrices n'est pas modifiée de celle du polypeptide encodé par le clone Gal1b (Figure 31).

Les mannanases recombinantes sont intéressantes car un peu plus de 60% de l'activité se retrouve au niveau du périplasme pour les clones Man1 et Man7. L'activité mannanase du clone Man4 est détectée à plus de 80% au niveau du périplasme. Malgré la plus petite taille de l'insert du clone Man4, ce clone contient peut-être une séquence signal importante pour la sécrétion laquelle n'est pas retrouvée chez les autres clones.

Les clones xylanase XylA, XylB et XylC ont également la même distribution entre eux. De l'activité xylanase a été retrouvée dans le milieu de culture mais le taux d'erreur étant élevé pour les triplicata, le niveau de sécrétion est incertain. Le taux d'expression est identique pour tous ces clones; ce qui laisse supposer que le même gène serait présent ainsi que les éléments promoteurs.

Pour ce qui est finalement des xylosidases recombinantes, malgré qu'elles soient le produit d'un insert de même taille sur gel d'agarose, la distribution de l'activité est différente mais le taux d'expression est le même. Les clones Xylo1 et Xylo2 ont une expression intracellulaire et l'activité xyloxidase se retrouve au niveau du périplasme pour le clone Xylo3. Cette différence dans la distribution peut être expliquée par la présence d'une séquence signal pour le clone Xylo3.

Les dosages d'activité ont été faits seulement sur des cultures des différents clones qui ont poussé pendant 18 heures à 37°C dans un milieu de

culture DYT (Sambrook et al., 1989). Puisque plusieurs clones ont été isolés pour chaque type d'activité, cette étude préliminaire a permis de comparer la distribution de l'activité ainsi que le taux d'expression des divers clones. Cependant, comme mentionné au point précédent, des études plus poussées pourraient mener à une optimisation de l'expression (par exemple, faire pousser les bactéries en présence de substrat). Bien sûr, le sous-clonage des clones dans un vecteur d'expression où la production de protéines recombinantes serait sous le contrôle d'un promoteur efficace améliorerait la quantité de polypeptides recombinants.

4.5.3. Activités *in situ* en électrophorèse (zymogrammes)

La détection de l'activité des protéines recombinantes après migration sur gel de polyacrylamide (zymogramme) a permis de déterminer la taille de celles-ci à partir d'extraits intracellulaires et périsplasmiques bruts. Après une électrophorèse SDS-PAGE, il n'a été possible de retrouver que l'activité des mannanases et xylosidases. Les activités galactosidases et xylanases ont été détectées en faisant migrer les extraits protéiques sur des gels de polyacrylamide sous conditions non dénaturantes et non réductrices.

Le zymogramme des galactosidases recombinantes et de la galactosidase purifiée de *B. stearothermophilus* montre une seule bande jaune (résultant de la production de *p*-nitrophénol) de même taille pour toutes les fractions (périsplasmiques ou intracellulaires). Il en est de même pour le zymogramme des

xylosidases. Donc, il est suggéré que les clones codent pour le même polypeptide que celui purifié chez le bacille, ou du moins pour un polypeptide de même taille.

Les zymogrammes des mannanases et des xylanases, pour leur part, montrent plusieurs bandes claires qui représentent des protéines de la même masse moléculaire que les hémicellulases purifiées de *B. stearrowthermophilus*. Il est intrigant de remarquer un patron de plusieurs bandes même si la coloration au bleu de Coomassie ne montre qu'une seule bande pour les protéines purifiées (le gel de polyacrylamide ne contenait pas de substrat). La migration des protéines doit alors être affectée par la présence du substrat dans le gel de polyacrylamide. La LBG et la xylane d'avoine étant des hétéropolymères de taille variée, les protéines ont une masse moléculaire apparente modifiée selon le degré de polymérisation du substrat pour lequel elles ont une affinité.

4.5.4. Séquence N-terminale de la galactosidase et de la mannanase

Les galactosidase et mannanase ont été électrotransférées sur membrane PVDF (BioRad) puis séquencées par la réaction de dégradation d'Edman (Matsudaira, 1989). Les séquences N-terminales retrouvées (figure 35) ne montrent pas de forte homologie avec d'autres hémicellulases rapportées dans la banque de données de GenBank (TFasta fait dans les 6 cadres de lecture). Seule une porine (retrouvée à membrane de la bactérie) de *Pseudomonas aeruginosa* (No. Acc. X53313) donne une identité de 53% avec la séquence N-

terminale des mannanases B et C. Les mannanases B et C ont toutes deux la même séquence N-terminale (figure 35), ce qui démontre qu'elles sont identiques et que leur séparation en chromatographie à interactions hydrophobes se produit par un changement mineur de conformation ou par quelques résidus modifiés. La mannanase C digérée par la protéinase K résulte en un seul polypeptide d'environ 40 kilodaltons ayant une nouvelle séquence N-terminale. Ce polypeptide a pu être également séquencé et ne montre pas, lui non plus, d'homologie intéressante avec les autres séquences protéiques de la banque GenBank.

Les clones positifs pour les galactosidase et mannanase étaient déjà isolés de la bibliothèque d'ADN génomique de *B. stearrowthermophilus*. Il était alors intéressant de vérifier si la séquence N-terminale des protéines purifiées et caractérisées faisait partie de la protéine recombinante correspondante. Des sondes déduites de la séquence N-terminale de la galactosidase et de la mannanase ont donc été utilisées pour des expériences d'hybridation à température élevée de séquençage par PCR (figure 36). Les clones Man1, Man4 et Man7 ont été hybridés à une région commune puisque la réaction de séquence réalisée avec les didésoxythymidine-triphosphates (ddTTP) a donné le même résultat, c'est-à-dire que les bandes d'ADN ont toutes migrées à la même position sur le gel de polyacrylamide-urée de séquençage (figure 37). Ce résultat confirme ceux obtenus pour les zymogrammes où la mannanase purifiée à partir de cultures de bactéries possède une masse moléculaire très semblable à celle

des protéines recombinantes. La prochaine étape sera donc de séquencer la région codante entière à partir de cet oligonucléotide. Au lieu de risquer de devoir séquencer les 7.8 kilobases du clone Man4 (qui est le clone ayant le plus petit insert) au complet, seulement une longueur d'un peu plus de 2 kilobases (pour une protéine de la taille de la mannanase soit 73 kDa) pourra être analysée (région codante et région promotrice). Ainsi, la séquence entière du gène codant pour la mannanase recombinante pourra être comparée à celles déjà séquencées et clonées (Akino et al., 1989; Arcand et al., 1993; Lüthi et al., 1991).

La sonde d'acides nucléiques déduite de la séquence N-terminale de la galactosidase n'a pas permis d'obtenir une séquence d'ADN par PCR. Il est alors possible que la galactosidase recombinante soit différente de celle purifiée biochimiquement, qu'elle soit incomplète (il lui manque une partie de la région N-terminale) ou bien que la sonde déduite dégénérée soit trop différente de la séquence d'intérêt, ne permettant pas ainsi l'hybridation à température élevée. Il se peut aussi que, vu le faible rendement de séquençage de la protéine (V. section 3.6.1), la séquence N-terminale obtenue par dégradation d'Edman soit celle d'une protéine contaminante comigrant avec la galactosidase en SDS-PAGE. La galactosidase serait alors bloquée en position N-terminale.

4.6. Séquençage du gène de la chitosanase

La séquence du clone pBR172 a été comparée à celles de la banque de séquences de GenBank. Cette séquence s'est révélée être très homologue à

une séquence codant pour la cellulase Endo-K de *Bacillus* sp. KSM-330 (Ozaki et al., 1991; numéro d'accès M68872). Cette homologie est de 80% au niveau nucléotidique et de 93% au niveau des résidus d'acides aminés déduits, pour les nucléotides 340 à 1320 (résidus d'acides aminés -6 à 320). Dans la région 5', l'homologie au niveau des acides aminés diminue à 32% (résidus d'acides aminés à la position -46 à -6). Pourquoi y a-t-il une si importante diminution de l'homologie? Cette région 5' correspond au peptide signal qui sert à la sécrétion de la protéine et ne fait pas partie de la protéine mature sécrétée. Cette région est moins conservée entre les différents genres de bactéries (et espèces, en général) et est sans conséquence sur la protéine mature (vonHeijne, 1986; Model et Russel, 1990).

	-3			1									10	
Séquence	<u>A</u>	A	A	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>N</u>
N-ter	V	G	A	K	E	M	K	P	F	P	Q	Q	V	N
Endo-K	A	V	A	K	E	M	K	P	F	P	Q	Q	V	N

									20					
Séquence	<u>Y</u>	A	<u>G</u>	V	I	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	H	<u>V</u>	T	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>S</u>
N-ter	Y	A	G	V	I	K	P	N	N	V	T	Q	E	S
Endo-K	Y	S	G	I	L	K	P	N	H	V	S	Q	E	S

					30									
Séquence	<u>L</u>	<u>N</u>	A	S	<u>V</u>	R	S	<u>Y</u>						
N-ter	L	N	A	K	K	T	S	Y						30/36
Endo-K	L	N	N	A	V	K	N	Y						27/36

Figure 40: Alignement de la séquence en N-terminal déduite du clone pBR172 (Séquence) avec celle de la chitosanase A purifiée (N-ter) et celle de la cellulase Endo-K (Endo-K).

La figure 40 montre l'alignement des séquences d'acides aminés de la chitosanase A séquencée en N-terminal (N-ter), celle déduite à partir du clone pBR172 (Séquence) et de celle de la cellulase Endo-K de *Bacillus* sp. KSM-330 (Endo-K). Les résidus en caractère gras sont ceux qui sont identiques à la séquence du clone pBR172 seulement et non à l'autre séquence (qui est Endo-K

dans le cas d'un résidu de N-ter et qui est N-ter dans le cas d'un résidu de Endo-K). Ainsi, il y a 6 résidus qui sont communs entre la séquence N-terminale de la chitosanase A et la séquence du clone pBR172 exclusivement. Moins de résidus sont spécifiques entre les séquences de l'Endo-K et du clone pBR172, soit trois. Cela pourrait indiquer que le clone pBR172 pourrait peut-être être celui recherché qui code pour une chitosanase. Cependant la très grande homologie observée dans les régions C-terminales (93%) suggère que ce clone coderait pour une protéine ayant au moins une activité cellulase. Il n'est pas exclus que la protéine ait une activité chitosanase en plus de l'activité cellulase puisque certaines glycosidases ont un spectre de spécificité plus étendu que d'autres (Gilkes et al., 1984; Bielecki et Galas, 1991). Les travaux sur la caractérisation de la cellulase Endo-K ne montrent pas que cette enzyme ait une activité chitosanase (Ozaki et Itou, 1991). D'ailleurs, la chitosanase A possède une activité cellulase mais qui est beaucoup plus faible (0.64U/mg) que son activité chitosanase (148.2 U/mg) (Pelletier et Sygusch, 1989). Une toute récente publication du groupe de Brzezinski (Masson et al., 1994) montre la séquence de la chitosanase d'une streptomycète. L'homologie avec la seule autre chitosanase clonée, celle provenant de *B. circulans*, est de 40-45%. Il n'y a pas d'autre homologie pertinente, donc rien à propos de la cellulase Endo-K, d'après la recherche qu'ils ont effectuée dans les banques de données. Ce qui apporte un argument de plus pour conclure que le clone pBR172 qui est si similaire à l'Endo-K ne code pas pour une chitosanase. La séquence N-terminale obtenue à partir

de la chitosanase purifiée pourrait être celle d'une protéine contaminante, en l'occurrence une cellulase.

4.7. Produit de PCR de la région 5' du gène de la chitosanase

La région 5' du gène de la chitosanase étant moins homologue (32%) à la région correspondante du gène codant pour la cellulase Endo-K que pour les régions C-terminales (93%), une amplification *in vitro* par PCR englobant cette région a été faite sur de l'ADN génomique de *B. megaterium*. Puisque la longueur du seul produit de PCR obtenu est la même que la bande d'ADN obtenue en utilisant le clone pBR172 (qui code pour le gène chitosanase), cette région se retrouve également au niveau de l'ADN génomique. Ce n'est donc pas un fragment d'ADN s'étant rajouté lors des manipulations et de la création de la bibliothèque d'ADN génomique de *B. megaterium*.

4.8. Nouveaux aspects de la recherche dans le domaine

La production d'hémicellulases en grande quantité et l'obtention de ces enzymes purifiées afin d'éliminer les cellulases indésirées est un défi qui est maintenant relevé. En effet, la production d'hémicellulases recombinantes grâce à des vecteurs procaryotiques d'expression permet leur utilisation industrielle. De plus, il est avantageux de cloner dans des bactéries Gram positives où la sécrétion des protéines recombinantes est possible. Notons par exemple l'expression d'une xylanase de *Clostridium thermocellum* dans *B. subtilis* à un

niveau de 30 U/ml dans le milieu de culture (Jung et Pack, 1993) et la sécrétion d'environ 1.5 U/ml d'une xylanase de *B. subtilis* dans *B. cereus* (Tremblay et Archibald, 1993).

La recherche et le développement dans l'industrie des pâtes et papiers sont présentement axés sur l'élaboration de nouveaux procédés de blanchiment de la pulpe de bois moins polluants et moins coûteux. Les récents travaux de chercheurs de l'institut de recherche sur les pâtes et papiers du Canada (Paprican : "Pulp and Paper Research Institute of Canada") montrent clairement qu'un prétraitement par les xylanases est efficace afin de blanchir la pulpe en utilisant moins de chlore (Paice et al., 1992; Tremblay et Archibald, 1993). Il en résulte une diminution de la quantité de produits dérivés de la lignine polychlorés qui sont toxiques et rejetés dans les effluents. Un essai à l'échelle industrielle de ce biotraitement a été réalisé avec succès (Scott et al., 1993). De plus, l'utilisation de xylanase de *B. stearrowthermophilus* T-6 (qui est une enzyme thermostable et active à pH 9) dans un procédé de blanchiment sans chlore ("Totally Chlorine Free", TCF, où il y a combinaison d'oxygénations, de traitement enzymatique, de traitements au peroxyde et d'agents chélateurs de la pulpe) permet de produire un papier résistant et blanchi (Lundgren et al., 1994). Ces nouveaux procédés où les produits chlorés sont remplacés par le peroxyde et l'oxygène ou l'acide peracétique (Ragauskas et al., 1991) sont beaucoup plus écologiques et d'avenir.

Le choix de l'enzyme est important. Elle doit comporter les

caractéristiques recherchées, soit être thermostables et alcalophiles, afin d'être avantageuse et économique. Les enzymes qui proviennent de microorganismes thermophiles et plus récemment de thermophiles extrêmes sont de bonnes candidates et sont de plus en plus étudiées. L'équipe finlandaise de Viikari a tout récemment rapporté les avantages nommés ci-haut d'un prétraitement de la pulpe Kraft par une xylanase provenant de la bactérie thermophile *Dictyoglomus* sp. et qui est active à pH alcalin (Rättö et al., 1994).

Le nombre d'hémicellulases et surtout de xylanases, à cause de leur efficacité dans le prétraitement de la pulpe de bois (Tremblay et Archibald, 1993; Suurnakki et al., 1994), qui sont clonées et séquencées ne cesse d'augmenter depuis la dernière année. Les études de purification et de caractérisation de nouvelles hémicellulases sont maintenant réalisées en portant une attention particulière sur l'alcalophilie et la thermostabilité. De cette façon, les diverses hémicellulases sont comparées entre elles. Les revues des anglais Gilbert et Hazlewood (1993) et de l'équipe canadienne de Warren (Gilkes et al., 1991) sur les cellulases et les xylanases bactériennes font ressortir ce qui est connu pour l'instant grâce aux études comparatives de séquences primaires d'acides aminés déduites des séquences de nucléotides et de mutagénèse dirigée. Les points majeurs sont que ces glycohydrolases peuvent être constituées de trois types de régions: le domaine catalytique, le domaine de liaison à la cellulose ("Cellulose Binding Domain") et les séquences de liaison ("linkers"). Les cellulases et xylanases sont regroupées, pour le moment, en familles (A à J) selon les

similarités retrouvées dans le domaine catalytique (Gilkes et al., 1991). L'élucidation des structures tridimensionnelles de ce type d'enzymes permettra de mieux les comparer et de comprendre le mécanisme d'hydrolyse. Jusqu'à maintenant, la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de deux cellulases a permis d'identifier des résidus d'acides aminés acides essentiels dans le mécanisme moléculaire de catalyse acide-base (Rouvinen et al., 1990; Juy et al., 1992). Des xylanases ont aussi été cristallisées et leur structure tridimensionnelle élucidée (Wakarchuk et al., 1994; Derewenda et al., 1994).

Le mécanisme d'action est un autre aspect de la recherche sur les hémicellulases qui est en progression. Le synergisme qui existe entre les différentes hémicellulases doit également être analysé et étudié dans le but d'optimiser la dégradation des polysaccharides de la biomasse (He et al., 1994). De cette façon, des combinaisons efficaces d'enzymes recombinantes pourront être industriellement utilisées.

4.9. Conclusion

Les hémicellulases purifiées de la bactérie thermophile *B. stearothermophilus* ont des caractéristiques intéressantes. La mannanase et la galactosidase sont des enzymes spécifiques et efficaces (à cause du ratio V_{\max}/K_m) dans l'hydrolyse de leur substrat particulier, la LBG et le PNPGal respectivement. Leur thermostabilité est parmi les plus grandes rapportées jusqu'ici. Leur capacité d'hydrolyse à pH alcalin est un avantage de plus vers leur utilisation dans des procédés industriels de saccharification des déchets ou de blanchiment de la pâte de papier.

Le clonage de quatre types d'hémicellulases, soit la galactosidase, la mannanase, la xylanase et la xylosidase a été réalisé. Ces protéines recombinantes sont toutes actives et de même masse moléculaire que leur homologue purifiée dans ce travail de *B. stearothermophilus*. Ces protéines pourront être surexprimées afin d'en produire des quantités suffisantes et permettre leur caractérisation et la détermination de leur structure tridimensionnelle. Le mécanisme moléculaire de catalyse et aussi d'adsorption au substrat qui est hétérogène pourra alors être élucidé. Ce qui ajoutera aux connaissances jusqu'à présent sommaires sur ce type d'enzyme, les glycanases.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier Dr Jurgen Sygusch, mon directeur de recherche, de m'avoir appuyée et encouragée durant mes études graduées. Merci de m'avoir fait confiance dès les stages d'été. Son esprit critique et rigoureux ainsi que ses encouragements ont su me motiver et lancer ma carrière en recherche.

Je remercie également Dr Gilles Dupuis pour ses discussions et conseils judicieux et Dr Jean-Pierre Perreault de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Un merci tout spécial à Danièle Beaudry qui m'a initiée aux joies du travail de laboratoire. Elle a su me transmettre le souci d'accomplir un travail bien fait et précis. Je remercie tous mes collègues de laboratoire et du département de Biochimie qui m'ont appuyée, particulièrement Anne Pelletier et Marie-France Palin pour leurs discussions fructueuses, ainsi que Nathalie Éthier qui a contribué à ce projet durant deux étés. J'aimerais aussi souligner l'appui de mes collègues de travail actuels dans la rédaction de ma thèse.

Je remercie infiniment tous mes proches de leur soutien. Mille mercis à mon complice dans la vie, Luc, qui a su être compréhensif et qui m'a concrètement aidée et moralement soutenue durant ces années.

Finalement je remercie le fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (fonds FCAR) pour l'aide financière accordée.

BIBLIOGRAPHIE

Aduse-Opoku J., L. Tao, J. J. Ferretti et R. R. B. Russell. 1991. Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans* α -galactosidase. J. Gen. Microbiol. **137**: 757-764.

Akino T., C. Kato et K. Horikoshi. 1989. Two *Bacillus* β -mannanases having different COOH termini are produced in *Escherichia coli* carrying pMAH5. Appl. Env. Microbiol. **55**: 3178-3183.

Allan G. G., L. C. Altman, R. E. Bensinger, D. K. Ghosh, Y. Hirabayashi, A. N. Neogi et S. Neogi. 1984. Biomedical applications of chitin and chitosan. Dans Chitin, chitosan, and related enzymes, J. P. Zikakis (éd.), Academic Press, Orlando, pp. 119-133.

Ando A., K. Noguchi, M. Yanagi, H. Shinoyama, Y. Kagawa, H. Hirata, M. Yabuki et T. Fujii. 1992. Primary structure of chitosanase produced by *Bacillus circulans* MH-K1. J. Gen. Appl. Microbiol. **38**: 135-144.

Araki T. et M. Kitamikado. 1982. Purification and characterization of a novel exo- β -mannanase from *Aeromonas* sp. F-25. J. Biochem. **91**:1181-1186.

Araujo A. et O.P. Ward. 1990a. Hemicellulases of *Bacillus* species: preliminary comparative studies on production and properties of mannanases and galactanases. J. Appl. Bacteriol. **68**: 253-261.

Araujo A. et O.P. Ward. 1990b. Mannanase components from *Bacillus pumilus*. Appl. Env. Microbiol. **56**: 1954-1956.

Arcand N., D. Kluepfel, F. W. Paradis, R. Morosoli et F. Shareck. 1993. β -mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the manA gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **290**: 857-863.

Ausubel F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith et K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Inter-Science, John Wiley and Sons, USA.

Azzi A. 1991. Purification et caractérisation d'une xylanase et d'une β -xylosidase de *Bacillus stearothermophilus*. Thèse (M. Sc.), Université de Sherbrooke. 75p.

Bachmann S. L. et A. J. McCarthy. 1989. Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermomonospora fusca*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 293-299.

Bawden M. J., T. Litjens, T. R. Hercus, B. K. May et W. H. Elliott. 1987. Extracellular protease production by *B. amyloliquefaciens*. Dans *Extracellular enzymes of microorganisms*, J. Chaloupka et V. Krumphanzl (éd.), Plenum Press, New York, pp.89-92.

Bernfeld P. 1955. Amylases, α and β . *Methods Enzymol.* **1**: 149-158.

Bernier R.L. 1995. Communication personnelle de Zeneca Bio Products, Mississauga, Ont.

Bielecki S. et E. Galas. 1991. Microbial β -glucanases different from cellulases. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 275-304.

Biely P., D. Kluepfel, R. Morosoli et F. Shareck. 1993. Mode of action of three endo- β -1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. Biochim. Biophys. Acta **1162**: 246-254.

Bierry H. et J. Giaja. 1912. Enzymes which attack mannans, galactans, and celluloses. Biochem. J. **40**: 370.

Bowie J.U., J.F. Reidhaar-Olson, W.A. Lim et R.T. Sauer. 1990. Deciphering the message in protein sequences : tolerance to amino acid substitutions. Science **247**:1306-1310.

Brock T.D. 1986. Dans Thermophiles: general, molecular, and applied microbiology. John Wiley & Sons, New York, 197-215.

Brown R.E., K.L. Jarvis et K. Hyland. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. Anal. Biochem. **180**: 136-139.

Burstein C. et A. Kepes. 1971. The α -galactosidase from *Escherichia coli* K₁₂. Biochim. Biophys. Acta **230**: 52-63.

Civas A., R. Eberhard, P. Le Dizet et F. Petek. 1984a. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii* mycelial α -D-galactosidases. Biochem. J. **219**: 849-855.

Civas A., R. Eberhard, P. Le Dizet et F. Petek. 1984b. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Secreted α -D-galactosidase and β -D-mannanase. Biochem. J. **219**: 857-863.

Clark T.A., A.G. McDonald, D.J. Senior et P.R. Mayers. 1990. Mannanase and xylanase treatments of softwood chemical pulps: effects on pulp properties and bleachability. Dans *Biotechnology in pulp and paper manufacture*, Kirk K. et H.H.M. Chang (éds.), Butterworth & Heinemann, London, pp. 153-167.

Coughlan M. P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Gen. Engineer. Rev.* **3**: 39-108.

Coulombe R. 1993. Structure tridimensionnelle de la fructose bisphosphate aldolase classe II de *Escherichia coli*. Thèse (M. Sc.), Université de Sherbrooke, 88 p.

Daneault C., C. Leduc et J.L. Valade. 1994. The use of xylanases in Kraft pulp bleaching: a review. *Tappi J.* **77**(6): 125-131.

Dekker R. F. et G. N. Richards. 1976. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 277-352.

deMontigny C. 1992. Purification et caractérisation de l'aldolase de *Thermus aquaticus*. Thèse (M. Sc.), Université de Sherbrooke, 71 p.

Derewenda U., L. Swenson, R. Green, Y. Y. Wei, R. Morosoli, F. Shareck, D. Kluepfel et Z. S. Derewenda. 1994. Crystal structure at 2.6-angstrom resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the family of beta-1,4-D-glycanases. *J. Biol. Chem.* **269**: 20811-20814.

Dill K. A. 1987. The stabilities of globular proteins. Dans *Protein Engineering*, D. L. Oxender et C. F. Fox (éd.), Alan R. Liss inc., New York, pp. 187-192.

- Ethier J. F., S. Harpin, C. Girard, C. Beaulieu, C. V. Déry et R. Brzezinski. 1994. Cloning of two xylanase genes from the newly isolated actinomycete *Actinomadura* sp strain FC7 and characterization of the gene products. *Can. J. Microbiol.* **40**: 362-368.
- Fink D., I. Boucher, F. Denis et R. Brzezinski. 1991. Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of a chitosanase-encoding gene from the actinomycete *Kitasatosporia* N174 isolated from soil. *Biotechnol. Lett.* **13**: 845-850.
- Flandroy L. 1991. Industrie papetière: une page à tourner. *Biofutur* **102**: 21-35.
- Ganter C., A. Böck, P. Buckel et R. Mattes. 1988. Production of thermostable, recombinant α -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J. Biotechnol.* **8**: 301-310.
- Gat O., A. Lapidot, I. Alchanati, C. Regueros et Y. Shoham. 1994. Cloning and DNA sequence of the gene coding for *Bacillus stearothermophilus* T-6 xylanase. *Appl. Env. Microbiol.* **60**: 1889-1896.
- Gherardini F., M. Babcock et A. A. Dalysers. 1985. Purification and characterization of two α -galactosidases associated with catabolism of guar gum and other α -galactosides by *Bacteroides ovatus*. *J. Bacteriol.* **161**: 500-506.
- Gherardini F. C. et A. A. Salyers. 1987. Characterization of an outer membrane mannanase from *Bacteroides ovatus*. *J. Bacteriol.* **169**: 2031-2037.
- Gianazza E. et P.G. Righetti. 1980. Facts and artefacts in isoelectric focusing. *Electrophoresis* **79**: 129-140.

Gilbert H. J. et G. P. Hazelwood. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 187-194.

Gilkes N. R., M. L. Langsford, D. G. Kilburn, R. C. Miller Jr. et R. A. J. Warren. 1984. Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. *J. Biol. Chem.* **259**: 10455-10459.

Gilkes N. R., B. Henrissat, D. G. Kilburn, R. C. Miller, Jr. et R. A. J. Warren. 1991. Domains in Microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* **55**: 303-315.

Grabski A. C. et T. W. Jeffries. 1991. Production, purification, and characterization of β -(1-4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 987-992.

Grüneninger H., B. Sonnleitner et A. Fiechter. 1984. Bacterial diversity in thermophilic aerobic sewage sludge III. A source of organisms producing heat-stable industrially useful enzymes, e.g., α -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 414-421.

Grüneninger H. et A. Fiechter. 1986. A novel, highly thermostable D-xylanase. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 309-314.

Hames B. D. et D. Rickwood. 1981. Dans Gel electrophoresis of proteins a practical approach. IRL Press, Oxford, 290 pp.

He L., G. F. Bickerstaff, A. Paterson et J. A. Buswell. 1994. Evaluation of catalytic activity and synergism between two xylanase isoenzymes in enzymic hydrolysis of two separate xylans in different states of solubility. *Enzyme Microbial Technol.* **16**: 696-702.

Herbert R.A. 1992. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol.* **10**: 395-402.

Hirano S. 1989. Production and application of chitin and chitosan in Japan. Dans *Chitin and chitosan Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, G. Skjak-Braek, T. Anthonsen et P. Sandford (éds.), Elsevier Applied Science, New York, pp. 37-43.

Jean P., J. Hamilton, et D.J. Senior. 1994. Mill trial experiences with xylanase: AOX and chemical reductions. *Pulp Paper Can.* **95**(12): 126-128.

Johnson K.G., J.D. Fontana et MacKenzie. 1988. Measurement of acetylxylan esterase in *Streptomyces*. *Meth. Enzymol.* **160**: 551-560.

Jurasek L. et M. G. Paice. 1988. Xylanase A of *Schizophyllum commune*. *Meth. Enzymol.* **160**: 659-662.

Kluepfel D. 1988. Screening of prokaryotes for cellulose- and hemicellulose-degrading enzymes. *Meth. Enzymol.* **160**: 180-186.

Kluepfel D. 1995. Communication personnelle.

Khasin A., I. Alchanati et Y. Shoham. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Env. Microbiol.* **59**: 1725-1730.

Khuad R. C. et A. Singh. 1993. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* **13**: 151-172.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.

Lahtinen T. 1994. Chlorine-free bleaching using enzymes, *Envirotech Sympo '94*, march 22, Vancouver B.C.

Lazo P. S., A. G. Ochoa et S. Gascón. 1978. α -Galactosidase (melibiase) from *Saccharomyces carlsbergensis*: structural and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **191**: 316-324.

Lee H.-B., R. L. Hong-You et P. J. A. Fowlie. 1989. Chemical derivatization analysis of phenols. Part VI. Determination of chlorinated phenolics in pulp and paper effluents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**: 979-984.

Lee Y.-E., S. E. Lowe et J. G. Zeikus. 1993. Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *Appl. Env. Microbiol.* **59**: 763-771.

Liao H., T. McKenzie et R. Hageman. 1986. Isolation of a thermostable variant by cloning and selection in a thermophile. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 576-580.

Liebergott N., B. van Lierop et B.I. Fleming. 1993. Methods to decrease and eliminate AOX in the bleach plant Part II: Lowering AOX levels in the bleach plant. *Pulp Paper Can.* **94**(11): 35-37.

Lischinig T., H. Purkarthofer et W. Steiner. 1993. Thermostability of endo- β -xylanase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 411-414.

Ludlow J. M. et D. S. Clark. 1991. Engineering considerations for the application of extremophiles in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 321-345.

Lundgren K. R., L. Bergquist, S. Hogman, H. Joves, G. Eriksson, T. Bartfai, J. Vanderlaan, E. Rosenberg et Y. Shoham. 1994. TCF mill trial on softwood Korsnas thermostable and alkaline stable xylanase T6. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 365-368.

Lüthi E., N. B. Jasmat, R. A. Grayling, D. R. Love et P. L. Bergquist. 1991. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a β -mannanase from the extremely thermophilic bacterium *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 694-700.

Masson J. Y., F. Denis et R. Brzezinski. 1994. Primary sequence of the chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases. *Gene* **140**: 103-107.

Matsudaira P. T. 1989. A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press, Toronto, 131 p.

McCleary B.V. 1979. Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume-seed D-galacto-D-mannans. *Carbohydr. Res.* **71**: 205-230.

McCleary B. V. 1988. β -D-Mannanase. *Meth. Enzymol.* **160**: 596-610.

McCleary B. V. 1988a. Soluble, dye-labeled polysaccharides for the assay of endohydrolases. *Meth. Enzymol.* **160**: 74-86.

McCleary B. V. 1988b. Carob and guar galactomannans. *Meth. Enzymol.* **160**: 523-527.

McCleary B. V. 1988c. α -D-Galactosidase from lucerne and guar seed. Meth. Enzymol. **160**: 627-632.

McCleary B. V. et N. K. Matheson. 1983. Action patterns and substrate-binding requirements of β -D-mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. Carbohydrate Res. **119**: 191-219.

McConnel D. J., B. A. Cantwell, K. M. Devine, A.J. Forage, B. M. Laoide, C. O'Kane, J. F. Ollington et P. M. Sharp. 1986. Genetic engineering of extracellular enzyme systems of Bacilli. Dans Biochemical engineering IV, H. C. Lim et K. Venkatasubramanian (éds.), New York Academy of Sciences, New York, 1-18.

Model P. et M. Russel. 1990. Prokaryotic secretion. Cell **61**: 739-741.

Mondou F., F. Shareck, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. Gene **49**: 323-329.

Moran Jr. C.P., N. Lang, S.F. J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero et R. Losick. 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. **186**: 339-346.

Morosoli R., J.L. Bertrand, F. Mondou, F. Shareck et D. Kluepfel. 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. Biochem. J. **239**: 587-592.

Nakamura S., K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono et K. Horikoshi. 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. Appl. Env. Microbiol. **59**: 2311-2316.

- Nakamura S., R. Nakai, K. Wakabayashi, Y. Ishiguro, R. Aono et K. Horikoshi. 1994. Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 78-81.
- Nagao Y., T. Nakada, M. Imoto, T. Shimamoto, S. Sakai, M. Tsuda et T. Tsuchiya. 1988. Purification and analysis of the structure of α -galactosidase from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**: 236-241.
- O'Connor B.I., T.G. Kovacs, R.H. Voss, P.H. Martel et B. van Lierop. 1994. A laboratory assessment of the environmental quality of alternative pulp bleaching effluents. *Pulp Paper Can.* **95**(3): 47-56.
- Ogasahara K., A. Imanishi et T. Isemura. 1970. Studies on thermophilic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. I. Some general and physico-chemical properties of thermophilic α -amylase. *J. Biochem.* **67**: 65-75.
- Olsen O., R. Borriss, O. Simon et K. K. Thomsen. 1991. Hybrid *Bacillus* (1-3, 1-4)- β -glucanases: engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 177-185.
- Olsson I., U. B. Axiö-Fredriksson, M. Degerman et B. Olsson. 1988. Fast horizontal electrophoresis I. Isoelectrofocusing and polyacrylamide gel electrophoresis using PhastSystem™. *Electrophoresis* **9**: 16-22.
- Ozaki K. et S. Ito. 1991. Purification and properties of an acid endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 41-48.
- Ozaki K., N. Sumitomo et S. Ito. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding an endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2299-2305.

Paice M. G. et L. Jurasek. 1984. Removing hemicellulose from pulps by specific enzymic hydrolysis. *J. Wood Chem. Technol.* **4**: 187-198.

Paice M. G., N. Gurnagul, D. H. Page et L. Jurasek. 1992. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 272-276.

Paoni N. F. et R. L. Arroyo. 1984. Improved method for detection of glycosidases in bacterial colonies. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:208-209.

Pederson D. M. et R. E. Goodman. 1980. Isozymes of α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Can. J. Microbiol.* **26**: 978-984.

Pederson L.S., A.M. Nissen, D.D. Elm et P.P. Choma. 1991. Bleach boosting of Kraft pulp using alkaline hemicellulases. International Pulp Bleaching Conference, Stockholm, Suède, 11-14 juin, A-06152.

Pelletier A., I. Lemire, J. Sygusch, E. Chornet et R. P. Overend. 1990. Chitin/chitosan transformation by thermo-mechano-chemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 310-315.

Pelletier A. et J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* P1. *Appl. Env. Microbiol.* **56**: 844-848.

Pelletier A. 1991. Valorisation de la chitine par sa transformation en produits chitine/chitosane variés, grâce à des procédés thermo-mécano-chimiques et enzymatiques. Thèse (Ph. D.), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 166 p.

- Peterson G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356.
- Priest F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 711-753.
- Priest F. G. 1987. Regulation of extracellular enzyme biosynthesis. Dans *Extracellular enzymes of microorganisms*. J. Chaloupka et V. Krumphanzl (éds.), Plenum Press, New York, pp 3-12.
- Ragauskas A. J., K. M. Poll et A. J. Cesternino. 1994. Effects of xylanase pretreatment procedures on nonchlorine bleaching. *Enzyme Microbial Technol.* **16**: 492-495.
- Rappe C. 1990 Environmentally stable chlorinated contaminants from the pulp and paper industry. Dans *Complex mixtures and cancer risk*. H. Vainio, M. Sorsa et A. J. McMichael (éds.) IARC, Lyon, pp. 341-353.
- Rättö M. et K. Poutanen. 1988. Production of mannan-degrading enzymes. *Biotechnol. Lett.* **10**(9): 661-664.
- Rättö M., K. Poutanen et L. Viikari. 1992. Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerant *Bacillus circulans* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 470-473.
- Rättö M., I. M. Mantrani, B. Ahring et L. Viikari. 1994. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. in enzymatic treatment of Kraft plups. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 130-133.
- Reese E. T. et Y. Shibata. 1965. β -Mannanases of fungi. *Can. J. Microbiol.* **11**:167-183.

- Rennell D., S. E. Bouvier, L. W. Hardy et A. R. Poteete. 1991. Systematic mutation of bacteriophage T4 lysozyme. *J. Mol. Biol.* **222**:67-87.
- Ristroph D. L. et A. E. Humphrey. 1985. Kinetic characterization of the extracellular xylanases of *Thermomonospora* sp. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 832-836.
- Roller S. et I. C. M. Dea 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12**: 261-277.
- Rowe J. J., I. D. Goldberg et R. E. Amelunxen. 1975. Development of defined and minimal media for the growth of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **124**:279-284.
- Royer J. C. et J. P. Nakas. 1990. Simple, sensitive zymogram technique for detection of xylanase activity in polyacrylamide gels. *Appl. Env. Microbiol.* **56**: 1516-1517.
- Sabbagh N. K. et I. S. Fagerson. 1973. Gel permeation chromatography of glucose oligomers using polyacrylamide gels. *J. Chromatogr.* **86**: 184-189.
- Sambrook J., E. F. Frisch et T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanford P. A. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applications. Dans *Chitin and chitosan Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, G. Skjak-Braek, T. Anthonsen et P. Sandford (éds.), Elsevier Applied Science, New York, pp. 51-69.
- Schmid R. D. 1979. Stabilized soluble enzymes. *Adv. Biochem. Eng.* **12**: 41-118.

- Schmid K. et R. Schmitt. 1976. Raffinose metabolism in *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem. **67**: 95-104.
- Schwarz W. H., H. Adelsberger, S. Jauris, C. Hertel, B. Funk et W. L. Staudenbauer. 1990. Xylan degradation by the thermophile *Clostridium stercorarium*: cloning and expression of xylanase, β -D-xylosidase, and α -L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **170**: 368-374.
- Scott B. P., F. Young et M. G. Paice. 1993. Mill-scale enzyme treatment of a softwood kraft pulp prior to bleaching. Pulp Pap. Can. **93**: T75-T79.
- Shareck F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. Gene **107**: 75-82.
- Sharp R. J., P. W. Riley et D. White. 1992. Heterothrophic thermophilic *Bacilli*, dans Thermophilic bacteria, J. K. Kristjansson (éd.), CRC Press, London, pp. 19-50.
- Shendye A., R. Gaikawari et M. Rao. 1994. Expression of the cloned xylanases from an alkalophilic, thermophilic *Bacillus* in *Bacillus-subtilis*. World J. Microbiol. Biotechnol. **10**: 414-416.
- Simpson H. D., U. R. Haufler et R. M. Daniel. 1991. An extremely thermostable xylanase from thermophilic eubacterium *Thermotoga*. Biochem. J. **277**: 413-417.
- Sundaram, T. K. 1986. Physiology and growth of thermophilic bacteria. Dans Thermophiles general, molecular, and applied microbiology, T. D. Brock (éd.), John Wiley & sons, New York, pp. 76-106.

Suurnakki A., A. Kantelinen, B. Hortling, J. Buchert et L. Viikari. 1994. Enzymatic solubilization of hemicelluloses in industrial softwood Kraft pulps. *Holzforschung* **48**: 291-296.

Talbot G. et J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Env. Microbiol.* **56**: 3505-3510.

Tolan J.S., D. Olson et R.E. Dines. 1994a. Survey of xylanase enzyme usage in bleaching in Canada. 81st Annual Meeting, Technical Section, Can. Pulp Paper Assoc., Montréal, B91-96.

Tolan J.S., M. Guenette, L. Thibault et C. Winstanley. 1994b. The use of a novel enzyme treatment to improve the efficiency of shive removal by bleaching. *Pulp Paper Can.* **95**(12): 488-493.

Tomazic S. J. et A. M. Klivanov. 1988. Why is one *Bacillus* α -amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another? *J. Biol. Chem.* **263**: 3092-3096.

Torrie J. P., D. J. Senior et J. N. Saddler. 1990. Production of β -mannanases by *Trichoderma harzianum* E58. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 303-307.

Torronen A., A. Harkki et J. Rouvinen. 1994. Three-dimensional structure of endo-1,4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. *EMBO J.* **13**: 2493-2501.

Tremblay L. et F. Archibald. 1993. Production of a cloned xylanase in *Bacillus cereus* and its performance in kraft pulp prebleaching. *Can. J. Microbiol.* **39**: 853-860.

Trudel J. et A. Asselin. 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **189**: 249-253.

Uchida Y. M. Izume et A. Ohtakara. 1989. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. Dans *Chitin and chitosan Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, G. Skjak-Braek, T. Anthonsen et P. Sandford (éds.), Elsevier Applied Science, New York, pp. 373-382.

Van Der Burg B., B. W. Dijkstra, G. Vriend, B. Van Der Vinne, G. Venema et V. G. H. Eijsink. 1994. Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface. *Eur. J. Biochem.* **220**: 981-985.

Viikari L., M. Ranua, A. Kantalinén, J. Sundquist et M. Linko. 1986. Bleaching with enzymes. Dans "Biotechnology in the pulp and paper industry: Proceedings of the third international conference." Swedish Forest Products Research Laboratory and Swedish Association of Pulp and Paper Engineers. Stockholm. pp. 67-69.

vonHeinje G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* **14**: 4683-4690.

Wakarchuk W. W., R. L. Campbell, W. L. Sung, J. Davoodi et M. Yaguchi. 1994. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus-circulans* xylanase. *Prot. Science* **3**: 467-475.

Whistler R.L. et C.C. Chen. 1991. Hemicelluloses. Dans *Wood Structure and Composition*, M. Lewin et I.S. Goldstein (éds.), Marcel Dekker Inc., New York. Chapitre 7: 287-319.

Williams P. P. et R. N. Doetsch. 1960. Microbial dissimilation of galactomannan. J. Gen. Microbiol. **22**: 635-644.

Williams J., H. Villaroya et F. Petek. 1978. α -Galactosidases II, III and IV from seeds of *Trifolium repens*. Purification, physicochemical and mode of action of galactomannan hydrolysis *in vitro*. Biochem. J. **175**: 1069-1077.

Yang R. C. A., C. R. Mackenzie, D. Bilous, V. L. Seligy et S. A. Narang. 1988. Molecular cloning and expression of a xylanase gene from *Bacillus polymyxa* in *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol. **54**: 1023-1029.

Zeilinger S., D. Kristufek, I. Arisan-Atac, R. Hodits et C. P. Kubicek. 1993. Conditions of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. Appl. Env. Microbiol. **59**: 1347-1353.

Zimmermann W. 1992. Bacterial degradation of hemicelluloses. Dans Metal ions in biological systems. Vol. 28: Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes. H. Sigel et A. Sigel (éds). Marcel Dekker, inc. New York, pp. 357-398.